

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
METROPOLITANA

225410

---

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



PRESENCIA Y DISTRIBUCION DE RECEPTORES  
MEMBRANALES ESPECIFICOS PARA  
PROGESTERONA EN LA MEMBRANA DEL  
ESPERMATOZOIDE DE CONEJO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA  
DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
P R E S E N T A :  
EFRAIN ISLAS OJEDA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

Q.F.B. ANA ELENA LEMUS BRAVO

MEXICO, D. F.

1996

## **DEDICATORIAS.**

**A tí Señor, por la vida, la capacidad  
y las oportunidades que me has brindado  
siempre.**

**A mis padres, Efraín y Mago, por su entrega,  
dedicación y amor que siempre me han brindado,  
ya que gracias a su apoyo hasta hoy he logrado  
todas las metas que me he propuesto.**

**A mi abuelo Jesús, que representa para mí  
ejemplo de luz y vida.**

**A mi abuelo Tomás, por sus consejos y experiencias  
de la vida.**

**Sandy, juntos con amor hemos recorrido ésta  
etapa de mi vida, hemos compartido el don que  
otorga el conocimiento y siempre compartiremos  
los frutos de éste esfuerzo.**

**A mis hermanos Edgar, Erick, Sarahí y Alfredo, con  
con quienes como familia compartimos los logros y  
fracasos con la misma fraternidad que nos une.**

**A mis tios Rosy y Efrén, Mago y Arturo,  
Tére y Ramiro, Maty y Baltazar, Jesús y Carmelita,  
Rosy y José, Juanita y Mario, Mary y Gil, por todo el  
cariño y apoyo de siempre.**

**A todos mis primos, con la esperanza de un futuro  
brillante para ustedes.**

**A quienes en el mundo luchan por encontrar la verdad,  
buscando ofrecer a la humanidad un mundo nuevo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**- A los Departamentos de Biología de la Reproducción de la UAM - Iztapalapa y del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zúbiran, por las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo.**

**- Dr. Adolfo Rosado García. Gracias por la oportunidad de compartir las maravillas de la biología de la reproducción, por su entera disposición para la realización de éste trabajo y por encender en mí la chispa de la investigación.**

**- A la Maestra Anaclena Lemus, por su confianza, amistad y apoyo incondicional para el desarrollo de esta etapa profesional.**

**- A mis amigos Mtro. Demetrio A. Ambriz García , Mtro. Jose Luis Contreras Montiel y Mtro. Pablo Damian M., por su apoyo y facilidades brindadas en sus laboratorios.**

**- A mis amigas, Marce, Gicela, Clara y Dalila, con quienes compartí mis dudas y logros durante el desarrollo de éste trabajo y de quienes siempre recibí las porras para seguir adelante.**

**- Al grupo de investigación del Laboratorio de Bioquímica Hormonal del INNSZ, por su apoyo y valiosos consejos para la metodología de éste trabajo.**

**- A los integrantes del Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I, por su valiosa ayuda para la realización de éste trabajo.**

**- A los profesores del Departamento de Biología de la Reproducción, por abrir en mí una ventana al conocimiento.**

**TRABAJO DE TESIS APOYADO POR CONACYT (Ref. 3176- M9307)**

# CONTENIDO

<b>1.-</b>	<b>INTRODUCCION . . . . .</b>	<b>1</b>
	1.0 MADURACION EPIDIDIMARIA	
	1.1 MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA PLASMATICA DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA	
	1.2 CAMBIOS EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA	
	1.3 EL PAPEL DE LAS ENZIMAS	
	1.4 CAMBIOS DE pH INTERNOS Y EXTERNOS QUE SUFRE EL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA	
	1.5 EFECTOS NO GENOMICOS DE LOS ESTEROIDES	
	1.6 EL METABOLISMO DEL CALCIO DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA	
	1.7 LOS FACTORES DESCAPACITANTES Y LOS FLUJOS DE CALCIO	
	1.8 IMPORTANCIA DEL CALCIO EN EL ESPERMATOZOIDE	
	1.9 INICIO DE LA REACCION ACROSOMAL. EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES	
<b>2.-</b>	<b>HIPOTESIS . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>3.-</b>	<b>OBJETIVOS . . . . .</b>	<b>32</b>
<b>4.-</b>	<b>MATERIAL Y METODOS . . . . .</b>	<b>33</b>
	4.1 MATERIAL BIOLOGICO	
	4.2 COMPUESTOS QUIMICOS	
	4.3 OBTENCION DE SEMEN DE CONEJO	
	4.4 OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE CONEJO	
	4.5 EVALUACION DE SEMEN Y LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE EPIDIDIMO	
	4.6 PURIFICACION DEL COMPLEJO P <sub>4</sub> - BSA- FITC	
	4.7 INCUBACION CON EL COMPLEJO P <sub>4</sub> - BSA- FITC	

<b>5.-</b>	<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>39</b>
5.1	PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LA REGION DE LA CABEZA DEL EPIDIDIMO	
5.2	PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LA REGION DEL CUERPO DEL EPIDIDIMO	
5.3	PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LA REGION DE LA COLA DEL EPIDIDIMO	
5.4	PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS POR EYACULACION	
5.5	GRUPOS CONTROL.	
5.6	EVALUACION DE LOS ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS TEÑIDOS CON P <sub>4</sub> -BSA-FITC	
<b>6.-</b>	<b>DISCUSION . . . . .</b>	<b>46</b>
<b>7.-</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS . . . . .</b>	<b>52</b>

## INTRODUCCION

### **1.0 MADURACION EPIDIDIMARIA**

Las características estructurales de los espermatozoides son el fiel reflejo de sus actividades funcionales únicas. El acrosoma contiene enzimas esenciales para la fertilización, mientras que el flagelo tiene la maquinaria y las fuentes de energía que son necesarias para su desplazamiento. La velocidad de desplazamiento y las modalidades de movilidad del espermatozoide tiene un patrón de maduración epididimaria similar para la mayoría de las especies de mamíferos, incluyendo al humano, (Yeung y Woolley, 1984).

Los espermatozoides de una gran variedad de especies de mamíferos hasta ahora estudiados, sufren una serie de modificaciones biomorfológicas durante su tránsito a través del epidídimo, donde fundamentalmente cambia su patrón de actividad flagelar y adquieren la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito,

Este conjunto de modificaciones forman parte del proceso denominado maduración del espermatozoide. Se entiende por maduración del espermatozoide al proceso biológico que se inicia durante su tránsito por el epidídimo, continúa después de la eyaculación y finalmente concluye en el tracto genital femenino mediante los procesos llamados capacitación y reacción acrosomal. Esta serie de modificaciones confiere al espermatozoide su capacidad funcional, movilidad y capacidad fertilizante (Hernández-Pérez y Rosado, 1988).

Desde un punto de vista morfológico durante la maduración epididimaria ocurre la migración de la gota citoplasmática y la maduración de algunos de los componentes cito-estructurales como el acrosoma, el núcleo y el flagelo (Hernández- Pérez y Rosado, 1988). En efecto los cambios existentes en la composición de la membrana y su organización contribuyen a las modificaciones bioquímicas y funcionales, las cuales están reflejadas por cambios en la carga de la superficie membranal, unión a lectinas, fluidez de la membrana, composición lipídica, composición de proteínas y la adición de anticuerpos que se unen al espermatozoide durante su viaje por el epidídimo (Eddy y O'Brien, 1994).

### **1.1. MODIFICACIONES DE LA MEMBRANA CITOPLASMICA DURANTE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA.**

Los espermatozoides de mamífero, durante su maduración en el epidídimo, sufren diferentes cambios en su membrana que contribuyen al desarrollo de la movilidad progresiva y la capacidad de fertilizar al ovocito. La maduración depende de cambios en la superficie membranal, los cuales pueden estar restringidos a regiones específicas de la membrana tales como la región del acrosoma, la región postacrosomal o segmentos flagelares y aún más, pueden suceder éstos tanto en el interior de la membrana (parte hidrofóbica) como en los exteriores de uno y otro lado de la misma. (Yanagimachi, 1981).

La maduración epididimaria, es acompañada de un incremento consistente en la viscosidad de la membrana. Se ha observado que el contacto de los espermatozoides con las secreciones de las glándulas accesorias durante la eyaculación incrementa este parámetro. Estos resultados llevan a pensar que la adquisición de la movilidad progresiva del espermatozoide y su capacidad fertilizante son, al menos en parte, debidas a las modificaciones en la fluidez de la membrana (Mercado y col., 1992).

Desde el descubrimiento en el plasma seminal del toro de una proteína estimuladora de la movilidad progresiva del espermatozoide (FMP) (Ascott y Hoskins; 1981), y la presencia de proteínas en el epidídimo (Brand y col., 1978) crean interés en el papel que juegan las proteínas secretadas por el epidídimo y el efecto que tendrían sobre la movilidad del espermatozoide, particularmente con respecto a las interacciones directas entre proteínas específicas del epidídimo y del espermatozoide. No transcurrió mucho tiempo en mostrarse que algunas de las proteínas que interactuaban con la membrana del espermatozoide eran sintetizadas en el epidídimo, encontrándose en la rata tres proteínas, de pesos moleculares 18.5 KDa, 19 KDa y 23 KDa, que son sintetizadas en la cabeza del epidídimo obedeciendo a un control hormonal (D' Agustino y Jones, 1980). Posterior mente estos mismos autores demostraron que estas proteínas son sintetizadas bajo el control hormonal de andrógenos y mostraban acciones similares a la  $\alpha$ -lactoalbúmina, sugiriendo también que actuaban en conjunto con las glicosidasas y las glicosiltransferasas epididimarias, las cuales modifican los azúcares de las glicoproteínas unidas a la superficie membranal del espermatozoide. Se ha observado también que existen diferencias sustanciales en la composición protéica del contenido luminal de la rete testis en comparación con la del plasma epididimario en la rata, y que existe una reorganización de la arquitectura molecular de la membrana del espermatozoide, observada por la disminución en la cantidad de proteínas durante su maduración en el epidídimo. No obstante esta disminución, no se presentan en todas las proteínas, las proteínas con 21KDa disminuyeron,

mientras las proteínas 23 KDa no mostraron cambios en su concentración, sugiriéndose que la modificación de la estructura proteica de la membrana del espermatozoide se modifica de una manera selectiva y específica.

Por otro lado Klinefelter y Hamilton (1984) al incubar espermatozoides de testículo de rata en segmentos tubulares de epidídimo, que aparentemente mantenían la integridad funcional y estructural de los epitelios luminales, demostraron que después de tres días de incubación los espermatozoides mostraban movimientos progresivos que implicaban que algunos aspectos de la maduración espermática habían ocurrido en este sistema *in vitro*. Al proseguir estos estudios, fué posible observar la participación de una molécula 46 KDa que pudo ser identificada como galactosil-transferasa y otra de 23 KDa que fué detectada con anticuerpos para  $\alpha$ -lactalbúmina (Klinefelter y Hamilton, 1985), sugiriendo que el complejo  $\alpha$ -lactalbúmina y la galactosil-transferasa se encuentran presentes en el epidídimo y que el proceso de maduración epididimaria comprende el proceso de glicosilación de algunas proteínas membranales del espermatozoide. El desarrollo progresivo de estos cambios modifica la capacidad de transporte y las actividades enzimáticas de la membrana plasmática, así como también afecta la habilidad de participación de la membrana en los eventos de reconocimiento y fusión durante la fertilización.

Es claro que muchos de los cambios de la superficie exterior de la membrana plasmática pueden atribuirse a la pérdida, adición, exposición o modificación de macromoléculas específicas, resultantes de la interacción del espermatozoide con el ambiente luminal del conducto epididimario (Olson y Danzo, 1981). Si bien algunos cambios externos en la superficie del espermatozoide son resultado de modificaciones intrínsecas de la membrana plasmática por la acción de las enzimas contenidas en el fluido luminal, también muchos de estos cambios son debidos al intercambio, o la unión pasiva a la superficie del espermatozoide de polipéptidos producidos por el epitelio del epidídimo (Olson y col., 1987).

Recientemente se ha observado que la interacción del espermatozoide con proteínas que forman parte del contenido normal del fluido luminal del epidídimo, contribuye al desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo del espermatozoide (Thomas y Meizel, 1984; Olson y col., 1987; Boué y Sullivan, 1993). En diversas especies, los espermatozoides adquieren esta capacidad como resultado de su estancia en regiones específicas del epidídimo, donde se secretan este tipo de macromoléculas que interactúan con la superficie del espermatozoide. Wong y Tsang (1982) presentan datos que sugieren la unión específica de un polipéptido con peso molecular de 32 KDa presente en el fluido luminal de la cola del epidídimo. Brooks y



Tiver, (1983) también presentan evidencias que indican que en condiciones in vitro un grupo suigeneris de polipéptidos del fluido luminal de la cola de epidídimo de la rata, se une específicamente, a espermatozoides inmaduros. Olson y col. (1987) demuestra que existen componentes proteicos con peso molecular de 26 KDa que están presentes en el fluido luminal de la cola del epidídimo de rata y que se unen a la membrana del flagelo del espermatozoide. Por medio de la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas se ha observado que los componentes 26 KDa pueden inicialmente localizarse sobre el espermatozoide a nivel de la parte proximal del cuerpo del epidídimo, uniéndose exclusivamente a la membrana del flagelo, observándose que la aparición de estos componentes proteicos preceden a la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Boué y Sullivan (1993), utilizando anticuerpos monoclonales para la proteína de peso molecular de 26 KDa encontrada en epidídimo de hámster, determinaron que el espermatozoide humano posee una proteína antigénicamente relacionada con la de hámster y también con un peso molecular de 26 KDa. Esta proteína se ha localizado en la región acrosomal de los espermatozoides obtenidos de la cabeza del epidídimo y se incrementa en los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. El efecto del anticuerpo contra esta proteína de 26KDa sobre la habilidad fertilizante del espermatozoide humano fue evaluada por ensayos de unión del espermatozoide a zona pelúcida de ovocitos de humano, encontrándose una disminución significativa en el número de espermatozoides que se unen a la zona pelúcida. También se observó un efecto de inhibición de la movilidad de los espermatozoides capacitados y tratados con este anticuerpo.

La función de los componentes proteicos aislados de las secreciones obtenidas de regiones específicas del epidídimo y que se unen selectivamente al espermatozoide se encuentran hasta el momento insuficientemente entendida sin embargo, los datos existentes sugieren que los polipéptidos del epidídimo participan en la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide, aún cuando muchos de los componentes involucrados no han sido bien caracterizados. En el conejo, se ha descrito la presencia de un componente específico del epidídimo que actúa como estabilizador del acrosoma. Esta importante participación en la estabilización de la membrana previene la ocurrencia prematura de la reacción acrosomal. Sin embargo, este factor estabilizador de la membrana ha sido encontrado a lo largo de toda la membrana y no sólo en la región acrosomal, lo que sugiere que este factor tenga funciones estabilizadoras de orden más general (Thomas y Meizel, 1988). Así mismo en el espermatozoide de bovino se ha encontrado una proteína de origen epididimario, la cual se une a la superficie del espermatozoide y en conjunto con los inhibidores de la fosfodiesterasa, estimula la movilidad progresiva de los espermatozoides inmaduros (Acott y Hoskins, 1981).

Otro tipo de cambios que ocurren durante la maduración epididimaria incluyen modificaciones en la distribución sobre la superficie de sitios de unión para ConA y cambios en la cantidad y cinética de estos sitios de unión para otras diferentes lectinas. Olson y Danzo (1981), mencionan que existen cambios en la capacidad de aglutinación del espermatozoide de rata por acción de la ConA, indicando que existen entre 15 y 25% más de sitios de unión en la región de la cabeza que en la región de la cola del espermatozoide. En este mismo trabajo Olson demostró que tanto en la cola del espermatozoide como en la cabeza del mismo existen diferencias en el arreglo y abundancia de receptores a ConA relacionados con la permanencia del espermatozoide en epidídimo. En los conejos ha sido demostrado que durante el paso del espermatozoide de la cabeza del epidídimo a la cola del mismo, se presenta un incremento en la aglutinabilidad al ser incubados con aglutininas derivadas del germen de trigo (WGA), un ligero decremento de la aglutinabilidad por la lectina del *Ricinus communis* 120 (RCA) y, en cambio, no se observan cambios en la aglutinabilidad inducida por ConA (Nicoson y col., 1977). Hammerstedt y col. (1982), reportan la existencia de aglutinación masiva en los espermatozoides obtenidos de la región de cabeza y cola de epidídimos de oveja cuando estos son incubados con Con A, pero no en los obtenidos del cuerpo del epidídimo. En contraste, cuando son incubados con WGA, ésta no induce aglutinación en los espermatozoides de cabeza pero si la induce en los espermatozoides obtenidos de la parte proximal y distal de la cola del epidídimo.

Estas diferencias en la aglutinabilidad de los espermatozoides, reflejan los cambios que existen en los carbohidratos expuestos en la superficie membranal como son: D-Galactosa, L-Fructosa, N-ac-GLU-NH<sub>2</sub> Hammerstedt y col. (1982). Este grupo reporta también que existen cambios importantes en los puntos isoeléctricos de componentes aislados de la membrana, encontrando cambios en la carga neta del glicocalix de los espermatozoides epididimarios, observando que esta carga es alterada antes de que el espermatozoide entre a la parte media de la cabeza del epidídimo. También es posible asegurar que las alteraciones en la naturaleza y cantidad de sacáridos y glicoproteínas sobre la superficie del espermatozoide, señaladas como importantes durante el proceso de maduración epididimaria, son las probables responsables de la modificación en la carga neta superficial del espermatozoide a su paso por el epidídimo (Eddy y Deborah 1994).

## 1.2. CAMBIOS EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE LA MEMBRANA PLASMATICA DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACIÓN EPIDIDIMARIA.

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamífero provee un excelente modelo para estudiar la composición lipídica de la membrana y su función, ya que se sabe que algunas regiones específicas de la membrana del espermatozoide tienen funciones biológicas únicas. Durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo se ha observado que las modificaciones en la composición de lípidos de la membrana implican cambios en la estabilidad de la misma que son necesarios para evitar daños durante su almacenamiento en el epidídimo y durante el transporte de la célula espermática tanto en el tracto genital masculino como en el femenino. Como consecuencia de este efecto estabilizador se ha observado un incremento en la relación colesterol fosfolípidos de 0.2 a 0.4 % dando como resultado la disminución de la fluidez de la membrana. Ha sido demostrado que cuando los espermatozoides de cola de epidídimo son incubados con vesículas artificiales, liposomas, con alto contenido de colesterol se produce una inhibición de la capacitación (Davis, 1976), mientras que la remoción del esteroles de la membrana plasmática está asociada con la capacitación y la reacción acrosomal (Davis, 1976). Es posible concluir que algunos de los cambios en la composición lipídica de la membrana espermática desempeñan un papel fundamental durante la organización molecular que es necesaria para la capacitación, la reacción acrosomal y la fertilización.

Por otra parte se ha demostrado que el desmosterol que está presente en el espermatozoide de epidídimo de hámster es convertido a sulfato de desmosterol durante la maduración epididimaria. Estas modificaciones en la constitución lipídica de la membrana plasmática también se han implicado como factores importantes en la modulación de la carga neta superficial del espermatozoide. Sin embargo, la presencia de desmosterol no ha sido demostrada en los espermatozoides de ovino, por lo tanto, en este caso, el incremento en la carga neta de la interfase agua-fosfolípido observado en la membrana plasmática, podría ser causado, en parte, por el incremento en el contenido de otros esteroles-sulfatos (Hammerstedt y col., 1979). Se ha observado también que la concentración de todas las especies de fosfolípidos, excepto los plasmalógenos derivados de la colina, decrecen coordinadamente durante la maduración epididimaria, lo cual sugiere que el espermatozoide utiliza cadenas de ácidos grasos o fosfolípidos constituyentes de su estructura membranal como fuente de energía.

En el verraco, se ha demostrado que el total de fosfolípidos contenidos en los espermatozoides disminuye durante la maduración epididimaria; la mayoría de los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) decrecen durante el paso del espermatozoide desde el testículo hasta la cola del epidídimo. Sin embargo, se ha visto que la composición inicial de ácidos grasos es restablecida durante la eyaculación (Evans y Setchell, 1979). Parks y Hammerstedt(1985), mencionan que el colesterol es el esteroide que se encuentra en mayor concentración en la membrana del espermatozoide epididimario. Así mismo, observa que los fosfoglicéridos forman del 70 al 80% de los fosfolípidos de la membrana y que la fracción ligada a etanolamina decrece durante la maduración epididimaria.

Recientemente Rana y col. (1991) señalaron que las membranas de espermatozoides obtenidos de la cabeza y el cuerpo del epidídimo de la mayoría de las especies estudiadas, presentan una composición lipídica más o menos constante, formada aproximadamente por el 75% de fosfolípidos, 15% de lípidos neutros y 10% de glicolípidos. Estos autores también señalan que durante la maduración epididimaria existe una disminución significativa del 25% del total de lípidos, los fosfolípidos se reducen en un 30% y los glicolípidos en un 80%.

Se ha observado que el colesterol es transportado a través de la membrana de los espermatozoides por medio de una proteína, a partir de fuentes como el fluido epididimario, durante la maduración de estos (Margaree y col., 1993).

### **1.3 EL PAPEL DE LAS ENZIMAS**

El espermatozoide sufre diversas alteraciones a nivel bioquímico durante su paso por el epidídimo. Algunas de estas alteraciones reflejan la existencia de interacciones moleculares entre el espermatozoide y los componentes de la secreción epididimaria. Entre los componentes bioquímicos, incluyendo enzimas, que han sido estudiadas y que, posiblemente, participan en el proceso de la maduración epididimaria deben señalarse las poliaminas: espermidina y espermina, cuya concentración es alta en las secreciones que se hayan en contacto con el espermatozoide. En las células somáticas se ha observado que estas sustancias participan como mediadores generales de la síntesis de RNA y proteínas. También debe considerarse la presencia de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima que participa igualmente en la regulación del proceso de síntesis de ácidos nucleicos. Esta enzima es de particular importancia porque se ha observado que puede ser rápidamente activada por la testosterona en los tejidos blanco de esta hormona.

Purvis y Col, (1993), demostraron que la  $\alpha$ -glucosidasa, conocida como un marcador de la función secretora del epidídimo humano, participa en la modificación de la composición glicoprotéica de la superficie del espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo. Estos mismos autores estudiaron los cambios en la actividad metabólica del epidídimo, reflejada en las concentraciones de ODC y de poliaminas, relacionándola con la distribución epididimaria de la  $\alpha$ -glucosidasa y ellos encontraron que existen regiones discretas de la cabeza y de la cola del epidídimo en donde se observa un incremento significativo en la actividad de ODC, lo que sugiere un alto grado de actividad metabólica en esas regiones. Esta hipótesis es confirmada por modificaciones similares observadas en las concentraciones de espermidina y espermina. Este mismo estudio muestra que el pico inicial de síntesis de poliaminas se puede correlacionar con el incremento en la concentración de andrógenos encontrada en los segmentos proximales del epidídimo y el aumento de la actividad de ODC en la región caudal del mismo. Los resultados de estos investigadores sugieren que la función de almacenamiento de espermatozoides del epidídimo, así como su participación en el proceso de maduración de éstas células, no es una función puramente pasiva, sino que las células epiteliales que constituyen la pared epididimaria se encuentran activamente involucradas en la síntesis de RNA, proteínas y enzimas que probablemente participan en estos procesos.

Por otro lado desde hace algunos años, se ha mencionado que la membrana plasmática del espermatozoide durante su estancia en el testículo se cubre con varias macromoléculas (proteínas, antígenos). Estas moléculas, durante el transcurso por el epidídimo, pueden cambiar su localización, modificarse, intercambiarse o perderse, mientras que nuevas macromoléculas se integran a la membrana del espermatozoide (Yanagimachi, 1988). Recientemente Boué y Sullivan (1993), señalaron que la interacción entre el espermatozoide y el ovocito requiere de una serie de modificaciones, parcialmente controladas por la adquisición de nuevas proteínas durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo, demostrando que la proteína 26 KDa encontrada en espermatozoides de humano y relacionada antigénicamente con la encontrada en los espermatozoides de hámster, está involucrada en el proceso de fertilización. De estos experimentos se ha concluido que la adición de estas macromoléculas, y la modificación consecutiva de las características metabólicas, son mediadas en parte por enzimas como la galactosiltransferasa y la sialiltransferasa presentes en el fluido epididimario (Yanagimachi, 1988). Evidentemente, los cambios coincidentes en la distribución y composición del glicocalix, así como de las partículas intramembranales, particularmente en la región acrosomal, durante el paso del espermatozoide por el epidídimo pueden cambiar la organización estructural de la membrana así como su función, (Olson y col., 1989; Hammertedt y col., 1982).

Con respecto a la adquisición de la movilidad progresiva, los cambios en el potencial de movilidad del espermatozoide pueden reflejar un incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc durante el tránsito por el epidídimo. Purvis y col.(1982) reportan que la concentración de AMPc y de GMPc en la secreción epididimaria, decrecen durante el tránsito del espermatozoide a través de este órgano, sugiriendo que esto es debido a su captación por las células espermáticas y consecuentemente al incremento intracelular de estos componentes. Estas observaciones implican, además, que los incrementos de AMPc que ocurren en el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo, no son debidos únicamente a incrementos en la actividad de adenilato-ciclase y la reducción de la actividad de las fosfodiesterasas.

Se ha establecido que el  $Ca^{++}$  intracelular y el AMPc participan en la regulación de la biofísico-química funcional del espermatozoide, incluyendo la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal. Se ha observado también que las acciones del AMPc y el  $Ca^{++}$  son mediadas a través de su actividad sobre otras proteínas específicas como la proteína-quinasa A. Tanto la proteína-quinasa A, como la calmodulina (otro componente importante en las vías metabólicas en las que participa el  $Ca^{++}$ ) han sido identificadas bioquímicamente en extractos de espermatozoides y localizadas estructuralmente en las gametas por inmunofluorescencia indirecta (Pariset y col, 1985). Este autor reporta que existe un decremento progresivo de la concentración de calmodulina y, por el contrario, un aumento en la actividad de proteína-quinasa A dependiente de AMPc, durante el tránsito por el epidídimo. En contraste con la relación inversa encontrada entre los niveles de calmodulina y la adquisición del movimiento flagelar en los espermatozoides epididimarios, la concentración del AMPc mostró una interesante correlación positiva con este mismo parámetro.

Otras enzimas han sido relacionadas con la maduración del espermatozoide, tal es el caso de un tipo especial de  $\alpha$ -D-manosidasa que se localizó en el acrosoma del espermatozoide y cuyo pH óptimo de 4.4. Actualmente se ha descrito una variedad de esta enzima presente en la membrana plasmática del espermatozoide del epidídimo de rata, con un pH óptimo de 6.2-6.5. Esta enzima muestra su actividad liberando las moléculas de manosa, contenidas en los glicoconjugados. Es también importante mencionar que se ha encontrado que cationes divalentes como  $Cu^{++}$  y  $Zn^{++}$  son potentes inhibidores de la actividad de la  $\alpha$ -D-manosidasa membranal del espermatozoide (Tulsiani y col, 1989), lo cual nos hace recordar el papel que se le ha adscrito al zinc durante la capacitación del espermatozoide (Huacuja col, 1977).

La  $\beta$ -D-galactosidasa es una enzima que escinde las uniones  $\beta$ - de los residuos galactosil de una variedad de sustratos tanto naturales como artificiales. Esta enzima ha sido reportada en el testículo y el epidídimo de la rata. La actividad de la  $\beta$ -D-galactosidasa es alta, tanto en el fluido epididimario como en el tejido epididimario mismo. Skularek y col.(1993) estudiarón la posible acción de la  $\beta$ -D-galactosidasa de la cola del epidídimo sobre la estructura de la membrana del espermatozoide, presentando evidencias de la existencia de cambios moleculares durante el paso del espermatozoide a través del epidídimo debidos a la actividad de esta enzima. Estos autores también demostrarón que existe un cambio en la especificidad de la enzima por su sustrato dependiendo del pH del medio, y que existe un incremento significativo de la actividad de esta enzima entre la cabeza y la región proximal de la cola del epidídimo, mientras que la actividad disminuye hacia la porción distal de la cola.

#### **1.4 CAMBIOS DE pH INTERNOS Y EXTERNOS QUE SUFRE EL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA.**

Los cambios en las propiedades de la membrana plasmática y particularmente de las conductancias iónicas medidas a través de esta estructura, han demostrado ser potentes reguladores del metabolismo y la activación de la movilidad del espermatozoide de diferentes especies. Esto es particularmente cierto cuando estas modificaciones se producen como respuesta a cambios en las concentraciones de los factores medioambientales que rodean al espermatozoide. Además, los efectores que provocan modificaciones del pH intracelular parecen desempeñar el papel de segundos mensajeros (Busa y Nucitelli, 1984). El mejor ejemplo de esto es el efecto que tienen los cambios de pH en el espermatozoide de erizo de mar. En este caso, las gametas masculinas permanecen inmóviles y con su metabolismo respiratorio inhibido cuando su pH está dentro del rango de 7.3 a 7.5 e inician su movilidad y el consumo de oxígeno en respuesta al aumento del pH intracelular (Shapiro y col., 1985). Diversos autores sugieren que modificaciones del pH intracelular juegan un papel importante durante la activación de la movilidad de los espermatozoides de mamíferos. Por ejemplo, los espermatozoides de bovinos son almacenados en la cola del epidídimo en un estado quiescente (Carr y Acott, 1984) e inician su movilidad cuando son diluidos en plasma seminal o en soluciones bófer osmóticamente equilibradas. El estado quiescente de los espermatozoides de cola de epidídimo es mantenido por un factor no identificado presente en el fluido de la cola del epidídimo, el cual es activo a un pH de 5.5, pero no a un pH de 7.6 (Carr y Acott, 1984).

La movilidad de los espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo y diluidos o de espermatozoides eyaculados no es afectada cuando el pH del medio se encuentra en el rango de 6.0 a 8.5 (Carr y Acott, 1984). Sin embargo, la movilidad del espermatozoide es reducida de un 20 a un 100% cuando el pH se encuentra por debajo de 6.0 (Makler y col., 1981).

En las células eucarióticas el pH intracelular es controlado por una variedad de mecanismos, entre los que podemos mencionar: el antipuerto sodio-protón, el sistema de transporte de bicarbonato, la regulación de la permeabilidad de la membrana plasmática a los protones, el poder amortiguador de la célula, el potencial de la membrana misma, etc (Frelin y col., 1988). En los mamíferos el pH varía considerablemente de un punto a otro del tracto reproductivo femenino. La vagina es ácida, pH 4.0, el moco cervical es básico, pH 8.4, el pH del útero presenta normalmente un valor intermedio, pH 7.8 y, finalmente, el pH del fluido de los oviductos, en los primates, es alrededor de 7.1 a 7.3 durante la fase lútea del ciclo menstrual (Mass y col., 1977). Por lo tanto es esencial que el espermatozoide pueda mantener una buena movilidad en medios cuyo pH puede variar en un rango notablemente amplio.

Los espermatozoides de rata, como los de muchos otros mamíferos, carecen de movilidad activa y progresiva durante su estancia en la cola del epidídimo. En este caso, la iniciación de la movilidad parece ser acompañada de la producción de una alcalinización intracelular mediada por un mecanismo de intercambio sodio / protón (Wong y col., 1981; Wong y Lee, 1983). De manera similar, Babcock (1983), demostró que la alcalinización intracelular, dependiente de cambios en la concentración de potasio, estimula el metabolismo y la movilidad de espermatozoides epididimarios de toro. También se ha demostrado que la fosforilación de algunas proteínas membranales, proceso que acompaña la adquisición de la movilidad progresiva, es dependiente de cambios en el pH interno de los espermatozoides epididimarios de toro (Carr y Acott, 1989).

Recientemente, Gatti y col. (1993) han precisado que en los espermatozoides de toro y de cordero la maduración epididimaria del espermatozoide coincide con una acidificación del citosol, ocurriendo una alcalinización rápida durante el proceso de eyaculación. Los espermatozoides de estas especies animales tienen la propiedad de sufrir un rápido proceso de equilibrio entre el pH interno y el del medio exterior, de manera que su pH interno se modifica fácilmente después de cada paso de su maduración en epidídimo, equilibrándose con el medio externo. En cambio al diluir muestras de espermatozoides de cola de epidídimo de cerdo con soluciones de pH diferentes, el pH interno no fue afectado cuando la dilución se efectuó en presencia de sodio y/o potasio (Gatti y col., 1993).

Los resultados mencionados en el párrafo anterior, parecen excluir al espermatozoide de los simples mecanismos en donde el intercambio sodio-protón o potasio-protón son los mecanismos regulatorios del pH interno. Sin embargo el potencial de la membrana plasmática del espermatozoide de mamífero depende estrictamente del transporte del potasio (Gatti y col., 1993).

Babcock (1983), menciona que la alcalinización del interior del espermatozoide por cambios en el pH sólo es posible si existe potasio en el medio exterior. La vía por la cual el potasio actúa sobre el pH interno no ha sido bien aclarada, sin embargo es posible que los flujos de calcio funcionen por un intercambio  $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$  o por la existencia de canales de calcio dependientes de voltaje (Babcock y Pfeiffer, 1987). La actividad de diversas enzimas importantes en la regulación del metabolismo energético y de algunas otras proteínas que se unen al  $\text{Ca}^{2+}$  dependen del pH; no obstante, el incremento o decremento del pH externo puede actuar sobre otros mecanismos de permeabilidad de la membrana, así como también de la habilidad de metabolizar sustratos vía transportadores específicos de membrana (Ballesteros y col., 1983).

### 1.5 EFECTOS NO GENÓMICOS DE LOS ESTEROIDES

A partir del desarrollo de marcadores de alta especificidad que permitieron la demostración citoplásmica de los sitios de unión específicos, receptores, de esteroides a diferentes células de diferentes tejidos, la mayoría de los estudios realizados en este campo se han enfocado a la comprensión de la naturaleza y función de estos receptores presentes en el compartimiento soluble de las células blanco. La hipótesis resultante fue tomada como un mecanismo de acción universal de las hormonas esteroides. Sin embargo Baulieu (1978), demuestra que la progesterona, y otros esteroides, intervienen en la maduración del *Xenopus laevis*, siendo que estas células no contienen receptores citoplásmicos a esteroides. Lo que sugiere que la progesterona tenía este efecto por su interacción con la membrana de la célula.

La mayoría de los efectos directos de los esteroides, no mediados a través de su interacción con receptores citoplásmicos, son relacionados con cambios en la función membranal probablemente debidos a una interacción directa y específica del esteroide con este organelo. De este punto se plantean dos preguntas:

10. ¿De que manera se llevan a cabo los mecanismos de interacción de los esteroides con la membrana? y
20. ¿Que significación fisiológica tienen éstas interacciones?.

Acerca de los mecanismos propuestos que explican este tipo de acción de los esteroides, la hipótesis de la estabilización de la membrana fué recibida con general aceptación en la década de los sesentas y principio de los setentas. Esta teoría fué apoyada por numerosos experimentos y consideraciones teóricas. A lo largo del tiempo, varios autores reportaron la existencia de una buena correlación entre los efectos biológicos de los esteroides y su coeficiente de distribución entre el agua y los lípidos de la membrana (Duval, 1983). En adición, cuando consideramos los diversos efectos de los esteroides, incluyendo su acción sobre las membranas celulares, tales como sus propiedades anestésicas, la estabilización de la membrana lisosomal y la inhibición del transporte a nivel membranal, es notable aceptar que todos estos efectos sean producidos por la misma molécula. Esto sugiere la existencia de más de un mecanismo de acción a nivel membranal para algunas moléculas esteroides que, además, deben funcionar independientemente del sistema de receptores citoplásmicos.

Duval (1983), muestra una buena correlación entre el efecto de algunos esteroides sobre la hemólisis del eritrocito y su acción anestésica en el renacuajo. Aún más, la posibilidad de la interacción esteroide-membrana fué fácilmente relacionada con los conocimientos de la participación del colesterol en la arquitectura de la membrana y el control que ejerce sobre su fluidez (Duval, 1983). Este tema había sido revisado por Lenaz y col. (1978), quienes mencionan, brevemente que, a bajas temperaturas, la transición de la bicapa membranal pasa de un estado cristalino a un estado líquido. Bajo estas condiciones, el colesterol ejerce una acción licuefactora determinando la ocurrencia de un estado intermedio de gel en la bicapa membranal, sin embargo, aumentando la temperatura, el colesterol actúa condensando la estructura membranal y disminuyendo su fluidez.

Así también fué demostrado que algunos esteroides con propiedades anestésicas tales como la pregnenolona, la afaxolona, la pregnandiona o el glucocorticoide hidrocortisona, no cambian la temperatura de transición de las membranas (Lee y col., 1992).

La acumulación de moléculas hidrofóbicas alrededor de las membranas, así como su interacción con componentes lipídicos membranales es lo que comúnmente produce las alteraciones en las propiedades de la membrana que producen este tipo de moléculas. En relación a estas propiedades es importante mencionar que se han descrito varias acciones de los analgésicos locales que afectan las funciones de los polimorfonucleares y que incluyen: disminución de la fragilidad osmótica, disminución de la adhesividad entre célula y célula, inhibición parcial de la exocitosis, inhibición parcial de la locomoción y de la capacidad de ingestión de partículas (Duval, 1983). Estos eventos, los cuales en parte son atribuidos a la

habilidad de los componentes anestésicos para desplazar los iones de calcio desde el interior de la membrana, son muy similares a los observados en presencia de altas concentraciones de esteroides (Duval, 1983), lo cual sugiere que algunas de las acciones de los esteroides sobre la superficie celular, representan interacciones no específicas de estas moléculas con los componentes membranales.

## 1.6 EL METABOLISMO DEL CALCIO DURANTE LA MADURACION EPIDIDIMARIA

El calcio es importante en la regulación de algunas funciones del espermatozoide. La concentración de este ión tiene influencia sobre las características del movimiento del espermatozoide y su presencia es esencial para la fertilización (Yanagimachi, 1994). Sin embargo se conoce poco acerca de los mecanismos de transporte y regulación de la concentración intracelular del calcio en el espermatozoide.

En espermatozoides maduros de cola de epidídimo, se han encontrado grandes cantidades de calcio que se acumulan intracelularmente cuando éstos son suspendidos en bófers que contienen calcio (Babcock y col., 1976). Esta entrada de calcio al espermatozoide es fundamentalmente determinada por la actividad mitocondrial (Babcock y col., 1978). Durante su permanencia en la cabeza del epidídimo, los espermatozoides inmaduros acumulan grandes cantidades de calcio a partir del ambiente extracelular, lo cual no sucede en el caso de los espermatozoides, maduros, de cola de epidídimo (Hoskins y col., 1983).

La capacidad de transporte basal de calcio es relativamente alto en los espermatozoides de mamífero: ( $10$  a  $30 \text{ mM Ca}^{2+} / 10^8 \text{ Epz}$ ) y similar al encontrado en células tumorales (Landry y Lehninger, 1976). La capacidad para captar calcio por las células tumorales, es debida a una alteración en la permeabilidad al calcio (Cittadini y col., 1982). Una diferencia fundamental entre la capacidad de las células tumorales y el espermatozoide para transportar calcio se encuentra en el sustrato cuya presencia induce los máximos incrementos de calcio. En las células tumorales es necesaria la presencia de succinato y en los espermatozoides se requiere la presencia de sustratos energéticos como son la glucosa y el lactato. Debe mencionarse que el espermatozoide, siendo una célula altamente diferenciada, carece de algunas estructuras intracelulares activas en la fijación de calcio en las células somáticas, tales como el retículo endoplásmico y que, además, el espermatozoide de mamífero presenta una diferencia marcada en el arreglo de sus mitocondrias (Vijayaraghavan y Hoskins, 1989). El número de mitocondrias y el patrón de arreglo varían con la especie, pero, en general, las mitocondrias se

observan encontradas extremo con extremo formando una hélice alrededor del aparato flagelar y están íntimamente asociadas con la membrana plasmática (Eddy , 1988).

Se ha observado por otro lado, que el complejo glutamato - aspartato y el  $\alpha$ -glicerofosfato son poco responsables del cambio de equivalentes reductores entre el citosol y la mitocondria en las células somáticas y son por tanto de mínima importancia en los espermatozoides (Storey y Keyhan, 1977). Más en cambio la enzima lactato deshidrogenasa específica de espermatozoides (LDH-X) presente en el citosol espermático y mitocondrial, estimula el efecto de intercambio de equivalentes reductores (Storey y Keyhan, 1977).

Hamner (1973) y Yanagimachi (1994), evidencian que el importante incremento de calcio intracelular en el espermatozoide es dependiente de sustratos naturales exógenos. Así, el ingreso de calcio en presencia de lactato es notablemente mayor que los valores observados en presencia de glucosa, acetato o piruvato. El  $\beta$ -hidroxi-butarato es el siguiente en eficiencia relativa en la inducción de transporte de calcio. El ingreso de calcio estimulado por el lactato es debido al incremento intracelular de NADH (adenín-nicotín dinucleótido). Sin embargo el gran incremento de calcio sustentado en presencia de este sustrato no es debido directamente al incremento de la oxidación de NADH, sino al funcionamiento de un efecto regulatorio sobre el equilibrio de la concentración de calcio entre los medios intra- y extracelular dependiente del estado redox de los piridin nucleótidos mitocondriales. Debe hacerse énfasis en que el lactato es un componente habitual y abundante de las secreciones del tracto reproductivo de la hembra y del macho.

Vijayraghavan y Hoskins (1989), reporta que en espermatozoides inmaduros de cabeza de epidídimo la acumulación de calcio de fuentes exógenas es de 2 a 4 veces mayor que el observado en espermatozoides de cola de epidídimo. La acumulación de calcio en estas células es máximo en presencia de lactato como sustrato exógeno. Esta estimulación de la entrada de calcio en presencia de niveles óptimos de lactato (0.8 -1.0 mM) es alrededor de 5 veces mayor en espermatozoides de cabeza de epidídimo y 2 veces mayor en espermatozoides de cola de epidídimo, cuando son comparados con los valores observados en presencia de glucosa. Este autor enfatiza la importancia de la función mitocondrial en la acumulación de calcio por el espermatozoide de epidídimo de bovino y sugiere que la localización de la isoenzima LDH-X mitocondrial en espermatozoides de mamífero, esta involucrada en la regulación de la acumulación de calcio.

Se ha observado que el calcio participa en la regulación de la movilidad y en la producción de la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero (Tash y Means, 1982). También se ha reconocido que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel importante en la regulación del metabolismo de los nucleótidos cíclicos (Garbers y Kopf, 1980). Así, la correlación entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y la actividad del AMPc ha sido bien demostrada; los niveles de AMPc son positivamente correlacionados con el incremento de la movilidad del espermatozoide y la reducción de los niveles internos de AMPc producen un efecto reversible sobre la movilidad del espermatozoide (Tash y Means, 1982). Quien presentó evidencia directa de que el AMPc regula la movilidad espermática fué Linderman (1978), el cuál demostró que la adición de AMPc y ATP en un modelo de espermatozoides desprovistos de membrana plasmática por detergentes, producía un incremento medible en la proporción de células móviles y en la frecuencia de oscilación del aparato flagelar.

Por otra parte, también se ha presentado evidencia de que las enzimas necesarias para la fosforilación y desfosforilación de proteínas (Adenilato ciclasa, protein cinasas dependiente de AMPc y de  $\text{Ca}^{2+}$ , la AMPc fosfodiesterasa y diversos tipos de fosfatasa) estaban presentes en el espermatozoide de numerosas especies de mamífero (Hoskins y col., 1972). Un gran número de sustratos protéicos para la proteína cinasa dependiente de AMPc han sido identificados en fracciones solubles y membranas de espermatozoides de bovinos y humanos (Hoskins y col., 1983, Huacuja y col., 1977).

De estos y otros estudios, nació la hipótesis de que el AMPc estimulaba la fosforilación de algunas proteínas de los espermatozoides y que quizá este proceso se encontraba envuelto en la iniciación y mantenimiento de la movilidad espermática. La purificación parcial y caracterización de las protein cinasas del espermatozoide epididimario de bovino fue lograda inicialmente por Hoskins y col. (1972), quienes demostraron que la actividad citosólica de PK dependiente de AMPc, detectable por cromatografía, existía en el espermatozoide epididimario de bovino y que tal actividad enzimática podía ser demostrable en otra especie. Garbers y col. (1973), demuestran la existencia de tres tipos de PK dependientes de AMPc sobre la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide. Así mismo, Rosado et al. (1975) demuestran la presencia de receptores específicos para AMPc [ $\text{C}^{14}$ ] en la membrana del espermatozoide intacto de humano.

El mecanismo por el cual se regula el metabolismo del AMPc en el espermatozoide es aún desconocido. En particular se tiene la dificultad de identificar los efectores primarios de la adenilato ciclasa (ATP pirofosfato-liasa). Este sistema enzimático no responde a los efectores

típicos de las adenilato ciclasas de las células somáticas (Vgr. hormonas proteicas, catecolaminas, neurotransmisores, guanidin nucleotidos, etc.) (Hyne y col., 1979; Kopf y Garbes, 1980). Sin embargo, la acción del AMPc y del  $Ca^{2+}$  puede ser determinada, respectivamente, por la activación de las PK dependientes de AMPc (proteína cinasa A) y por la activación del mismo tipo de enzimas, pero dependientes de la presencia de calcio. Así, se ha demostrado (Kopf y Garbes, 1980) que ocurre una disminución del contenido de calmodulina durante la espermatogénesis mientras que las PK dependientes de AMPc incrementan su actividad durante la maduración epididimaria del espermatozoide. Pariset y col. (1983) demuestran que los niveles celulares de PK se correlacionan con el porcentaje de células móviles en muestras de semen humano.

Como se ha mencionado, la adquisición de la habilidad fertilizante del espermatozoide depende de las alteraciones que ocurren durante su progreso por el conducto epididimario. También se sabe que la región del cuerpo del epidídimo es una región crítica, especialmente para el desarrollo de la capacidad de movimiento y la capacidad fertilizante del espermatozoide (Olson y Danzo, 1981). En esta región los cambios en los niveles de calmodulina y PK, reflejan los efectos regulatorios del calcio y el AMPc sobre el proceso de maduración espermática que ocurren durante el tránsito del espermatozoide a través de este órgano. El tránsito epididimario por estas regiones fué caracterizado (Pariset col. 1985) por un decremento en el nivel de calmodulina y por otro lado se observó un incremento en la actividad de PK dependiente de AMPc. En contraste el nivel de calmodulina y la actividad de la PK dependiente de AMPc fué correlacionado con la adquisición del movimiento flajelar.

La actividad de la adenilato ciclasa de espermatozoides de equino es claramente inhibida por EGTA (un eficiente quelante para  $Ca^{2+}$ ), así como por la presencia de antagonistas bioquímicos de la calmodulina, lo cual indica la participación de los iones de calcio en el proceso de maduración de este tipo de espermatozoides. El calcio también juega un papel central en los mecanismos de exocitosis en muchos tipos de células, pudiéndose incluir dentro de este proceso la reacción acrosomal (RA) de los espermatozoides (Yanagimachi, 1981). En los espermatozoides de erizo de mar la RA aparece como resultado del transporte de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje (Schackmann y col., 1978).

Como se mencionó inicialmente, debe considerarse que el proceso de la maduración espermática continúa aún después de que los espermatozoides son eyaculados, y podemos

**CAMBIOS IMPORTANTES QUE SE HAN SUGERIDO COMO PARTICIPANTES EN EL FENÓMENO FISIOLÓGICO DE LA CAPACITACIÓN:**

- a) la eliminación o modificación de algunos componentes superficiales, adsorbidos o integrados a la membrana plasmática durante la maduración epididimaria y/o por contacto con el plasma seminal y que actúan como factor(es) descapacitante(s)
- b) la disminución de la carga neta negativa superficial, aparentemente por la pérdida de ácido siálico y de algunos compuestos sulfatados
- c) cambios en la distribución de glicoconjugados superficiales
- d) modificaciones en la distribución y contenido de antígenos de superficie
- e) cambios en el patrón de organización de las partículas intramembranales
- f) modificaciones en la conformación de las proteínas propias de la membrana
- g) cambios en la permeabilidad membranal a los iones, principalmente al calcio

considerar que dicho proceso termina hasta que el espermatozoide está completamente capacitado para penetrar al interior del ovocito y realizar la fertilización. Al respecto Austin en 1951 reportó que los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de realizar esta fertilización del ovocito, sino que adquieren esa habilidad después de estar un tiempo en el aparato reproductor femenino. Al año siguiente Austin denominó a este fenómeno "capacitación" para designar al paso de un espermatozoide eyaculado y aparentemente funcional a un estado con habilidad

fertilizante ( Fraser y Monks, 1990, Yanagimachi, 1994).

El desarrollo de las técnicas de capacitación in vitro han permitido la identificación de características bien definidas que hacen razonablemente fácil reconocer a los espermatozoides que han sufrido el proceso de capacitación. Una de ellas es la expresión de la movilidad hiperactiva y la otra la capacidad de experimentar la reacción acrosomal cuando son colocados en condiciones adecuadas (Langlais y col., 1988; Fraser y Monks, 1990).

La necesidad de la presencia de calcio en el medio extracelular para la inducción de la hiperactivación del espermatozoide ha quedado bien demostrada porque los espermatozoides de cobayo, de ratón y de hámster, incubados en medios desprovistos de calcio, no muestran nunca los movimientos típicos de la hiperactivación. Estos resultados han sido comprobados por el hallazgo de que los espermatozoides de estos animales preincubados por periodos prolongados en medios con presencia de calcio, inician casi inmediatamente las modificaciones en la movilidad que caracterizan la hiperactivación, cuando se agregan concentraciones adecuadas de calcio (2-5 mM) al medio de incubación ( Thomas y Meizel , 1988; Fraser y Ahuja, 1988).

Recientemente se demostró en el hámster que la expresión de la hiperactivación en los espermatozoides capacitados in vitro es precedida por una elevación en las concentraciones intracelulares del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y del calcio, asociada con una disminución en el pH intracelular. En los espermatozoides humanos se han demostrado cambios similares a los descritos anteriormente en las concentraciones intracelulares de calcio y protones, cuando son incubados en condiciones de capacitación (Yanagimachi, 1994), pero su relación con la hiperactivación no se ha establecido.

En numerosas especies de mamíferos, el calcio extracelular en concentraciones milimolares es necesario para sustentar la reacción acrosomal y la movilidad hiperactiva (Fraser y Mc Intyre, 1989). En el ratón el calcio también es requerido para la capacitación, pero los espermatozoides de esta especie requieren concentraciones de calcio un poco menores, estimándose que  $90\mu\text{M}$  es suficiente para sustentar la capacitación. En el caso de los mamíferos, se ha demostrado que una de las propiedades más importantes de la reacción acrosomal es que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es indispensable para que tal proceso ocurra. Cuando los espermatozoides se incuban y se tratan en medios libres de  $\text{Ca}^{2+}$  son incapaces de experimentar la reacción acrosomal, aún en los casos en que se adicionan al medio agentes que son reconocidamente capaces de inducirla. Sin embargo, no hay todavía ninguna evidencia directa de que la reacción acrosomal en estas especies de animales ocurra concomitantemente con un aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Yanagimachi, 1994). De modo semejante, la teoría de que el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  depende del aporte a partir de reservorios intracelulares, tampoco a sido consistentemente confirmada.

Los gradientes iónicos precisos que se requiere mantener a través de la membrana plasmática de los espermatozoides viables son regulados principalmente mediante ATPasas dependientes de sodio, potasio o calcio. La relación iónica intra/extracelular no es constante y se modifica durante la incubación en condiciones de capacitación. Estos movimientos iónicos tienen como resultado la activación de enzimas como la adenil ciclasa y algunas otras de localización acrosomal, y han sido asociados con los cambios en las características de la movilidad durante la capacitación (Langlais y col., 1988; Fraser y Monks, 1990; Yanagimachi, 1994).

Gordon y col. (1978) señalaron la presencia de una ATPasa dependiente de calcio en la membrana acrosomal externa de los espermatozoides de cobayo, sugiriendo que esta enzima bombea calcio hacia adentro del acrosoma, estimulando la reacción acrosomal. Ashraff y col. (1982) encontraron esta enzima en la membrana plasmática de la cabeza o el flagelo

espermáticos y García y col. (1992) demostraron la presencia de una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  no solamente en los espermatozoides de cobayo sin acrosoma, sino también en las membranas periacrosomal y acrosomal externa. La actividad asociada con la membrana plasmática representó cerca del 25% de la actividad enzimática total y fue, en condiciones basales, cerca del doble que la observada en la membrana acrosomal. Cuando se llevó a cabo la reacción acrosomal, la actividad enzimática experimentó un incremento significativo, comparada con la actividad presente en los espermatozoides controles y al mismo tiempo la enzima parece sufrir una redistribución subcelular.

La importancia de la participación de modificaciones en el transporte de los iones monovalentes en el proceso de capacitación y de la reacción acrosomal puede verse apoyada en las siguientes observaciones. Algunos estudios recientes han demostrado que el aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  estimula los procesos de exocitosis de varias estirpes celulares Suchard y col. (1982.). Se sabe que la reacción acrosomal en los espermatozoides de erizo de mar requiere la presencia de  $\text{Na}^+$  extracelular y se acompaña de un aumento en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  y de la liberación concomitante de  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$ . Se sabe también que este proceso de exocitosis se inhibe por las concentraciones altas de  $\text{K}^+$  en el medio. La inducción de la reacción acrosomal en los espermatozoides de esta especie de animales se acompaña de la desaparición del potencial de membrana.

La reacción acrosomal en los mamíferos ocurre solamente después de que el espermatozoide ha sido capacitado. Se ha demostrado que un aumento en la relación  $\text{K}^+ / \text{Na}^+$  en el medio de incubación estimula la frecuencia de fertilización de los ovocitos de ratón mantenidos *in vitro*. Mirsny y Meizel (1981) han demostrado que la reacción acrosomal del cobayo se acompaña de un aumento en el transporte de  $\text{K}^+$  del medio extracelular al intracelular. En contraste la capacitación del espermatozoide de cobayo se inhibe por la presencia de  $\text{K}^+$  extracelular (Rogers y col., 1981), posiblemente porque la  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPasa}$  del espermatozoide puede funcionar normalmente permitiendo el intercambio  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  y manteniendo una concentración intracelular baja de  $\text{Na}^+$ , lo cual dificulta la capacitación.

Se sabe que la monesina es un fármaco que puede estimular el intercambio neutro de  $\text{Na}^+$  extracelular por protones intracelulares a través de la membrana plasmática. La incubación de espermatozoides de cobayo en presencia de este ionóforo induce rápidamente la reacción acrosomal en presencia de concentraciones apropiadas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en el medio de incubación. Aunque es posible que el requerimiento que muestran los espermatozoides de cobayo de concentraciones altas de  $\text{Na}^+$  extracelular para ser capacitados sea debida a la

necesidad de un intercambio  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  que produzca un aumento en el pH intracelular, la evidencia experimental apoya mas claramente la necesidad de un aumento de la concentración de sodio intracelular per se (Hyne y col., 1984). Por ejemplo: la incubación en un medio libre de  $\text{Na}^+$ , pero en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y cloruro de amonio, sistema que se sabe induce un aumento del pH intracelular en varios tipos de células (Winkler y col., 1978), no permitió la inducción de la reacción acrosomal; la incubación en presencia de amiloride, un compuesto que inhibe el transporte pasivo de sodio, retardó notablemente el principio de la reacción acrosomal en varias especies de mamíferos.

También se han investigado los requerimientos de calcio suficientes para sustentar la RA en el espermatozoide humano mediante la evaluación de imágenes del microscopio electrónico. Los estados intermedios de la reacción acrosomal del espermatozoide humano paresen incluir la formación intraacrosomal de vesículas membranosas primeramente entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Nagae y col., 1987).

En espermatozoides humanos es necesaria la presencia continua de concentraciones milimolares de calcio para lograr una RA completa, cuando estos son incubados durante 24 hrs en un medio deficiente de calcio, la mayoría de las células permanecen en estados intermedios de la RA (Stock y col., 1989); solo la permanencia continua de concentraciones milimolares de calcio lograron la RA completa en la mayoría de las células.

Algunos de los cambios más importantes que contribuyen a definir la adquisición del estado de capacitación ocurren en la distribución de componentes y en modificaciones de la estructura membranal de las células espermáticas. La redistribución o los cambios estructurales en la topología superficial de las moléculas membranales pueden ocurrir, teóricamente, a través de varios mecanismos incluyendo:

1) enmascaramiento o desenmascaramiento de moléculas superficiales, tanto por adsorción de moléculas del solvente o por rearreglo de proteínas membranales intrínsecas; estos procesos modifican la exposición al medio ambiente de proteínas específicas, haciéndolas accesibles o inaccesibles como sitios de fijación o reconocimiento. Por supuesto que desde nuestro punto de vista, sería de la mayor importancia el demostrar que una de estas moléculas superficiales que se enmascaran durante el proceso de descapacitación son los receptores a la progesterona.

2) inserción local de moléculas por adsorción del medio ambiente o, por el contrario, supresión de las mismas por disolución en el medio de suspensión de la célula;

**3) migración de moléculas presentes en la superficie.** La migración lateral puede estimularse por la fijación de ligandos y es evidente en el fenómeno de "capping"; sin embargo, este tipo de migración se ha observado también en ausencia de interacción con ligandos. Un ejemplo puede ser el agrupamiento de los receptores a acetil colina en miotúbulos en cultivo, y por supuesto la aglomeración descrita de los receptores membranales a la progesterona durante el proceso de capacitación y como pre-requisito a la ocurrencia de la RA .

Las modificaciones en la topología membranal pueden propiciarse también por cambios en la composición de los lípidos, que a su vez pueden inducir el rearrreglo de las proteínas superficiales de acuerdo con las variaciones en la polaridad y composición bioquímica del medio ambiente.

### **1.7 LOS FACTORES DESCAPACITANTES Y LOS FLUJOS DE CALCIO**

Desde hace más de quince o veinte años se conoce la presencia en el plasma seminal, y en secreciones obtenidas de diferentes órganos del aparato reproductor masculino, de algunos componentes que previenen o revierten el proceso capacitación. Debido a que se han encontrado varias moléculas con estas características (glicoproteínas, polipéptidos, proteínas), su naturaleza bioquímica no ha sido completamente elucidada. Se ha sugerido que el(los) factor(es) descapacitante(s) actúa(n) en la membrana espermática bloqueando receptores, grupos funcionales, enzimas, mecanismos o canales de intercambio iónico, etc. y que sus funciones incluyen la protección de la integridad de los espermatozoides durante su estancia en el ambiente vaginal, así como la inhibición de la reacción acrosomal en regiones del aparato genital femenino que no son las apropiadas.

Una de las funciones que pueden ser inhibidas por la fijación de componentes descapacitantes del plasma seminal es el transporte de calcio que hemos descrito anteriormente. Esta inhibición modificaría sustancialmente los intercambios de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dependientes de las ATPasas membranales. Algunas observaciones que sostienen esta hipótesis son las siguientes. Los espermatozoides epididimarios de toro tienen la capacidad de acumular calcio rápidamente mientras que los espermatozoides eyaculados no lo hacen así. Esto sugiere que el contacto con el plasma seminal altera la capacidad de transportar calcio. Rufo y col.(1982) aisló del plasma seminal del bovino una proteína, llamada caltrina, que funciona como inhibidor del transporte de calcio, modulando el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Fraser (1984) aislaron del espermatozoide un factor descapacitante asociado a la superficie celular y que también se encuentra en el plasma seminal epididimario. Cuando este factor es eliminado,

por diversos medios, se estimula la capacidad fertilizante. Adicionalmente, se ha observado que la actividad de los factores descapacitantes se pierde cuando los espermatozoides son incubados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementándose paralelamente su capacidad funcional. Esto sugiere que los mecanismos involucrados en la inactivación / destrucción de los factores descapacitantes requieren la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.8 IMPORTANCIA DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN EL ESPERMATOZOIDE

Las membranas plasmáticas de muchos tipos de células contienen tres tipos diferentes de sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ :

- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje, los cuales se abren cuando la membrana se despolariza, produciéndose un gradiente electroquímico por medio del cual la membrana adquiere la posibilidad de transportar los iones. Este sistema de transporte muestra una enorme preferencia (>1000 veces) por el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre el transporte de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . Estos canales se han clasificado en cuatro tipos dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y de su susceptibilidad a algunos compuestos farmacológicos (Tsien y Tsien, 1990).

Se ha demostrado que los espermatozoides de erizo de mar tienen en su membrana canales de calcio dependientes de voltaje que son importantes en el intercambio de iones de calcio que son necesarios para producir la capacitación e iniciar la RA. Cuando estos canales son bloqueados con sustancias antagonistas, tales como el verapamil, se inhibe la reacción acrosomal. Sin embargo al usar los mismos componentes en espermatozoides de mamífero, no se reportaron efectos sobre el intercambio de iones ni sobre la estimulación de la reacción acrosomal ( Babcock y Pfeiffer, 1987, Fraser Monks, 1990).

Parece entonces evidente que el funcionamiento de los canales de calcio dependientes de voltaje es diferente en los espermatozoides de mamífero, puesto que, como hemos visto, ni el D600 ni el verapamil son capaces de inhibir la ocurrencia de la reacción acrosomal y por el contrario en algunos casos han sido señalados como activadores de este proceso (Roldan y col. 1986). Otra evidencia que señala que este tipo de transporte de calcio no funciona en los espermatozoides de mamífero es el hecho de que ni la despolarización ni la hiperpolarización de la membrana del espermatozoide del hámster producen la ocurrencia de la reacción acrosomal. Estos resultados parecen indicar que los canales de calcio no participan en el control de los movimientos de este catión divalente en los espermatozoides de los mamíferos. Sin embargo,

**EVIDENCIAS DE QUE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE MAMÍFERO NO POSEEN CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE:**

- a).- las modificaciones del potencial de membrana no parecen ser importantes en la ocurrencia de la reacción acrosomal.
- b).- Los antagonistas específicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje no inhiben la captación de calcio.
- c).- Los antagonistas específicos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje no previenen la ocurrencia de la reacción acrosomal (Roldan y col. 1986; Rink, 1977).

debe hacerse notar que Babcock y Pfeiffer (1987) han señalado que la exposición de espermatozoides de carnero a condiciones de despolarización provocadas por la concentración alta de  $\text{K}^+$  en medios alcalinos, indujo una elevación notable de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que los canales de calcio dependientes de voltaje existen en los espermatozoides de esta especie animal. Así mismo, Fraser y Monks (1990) demostraron que en el ratón la presencia de nifedipina, un conocido inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje, en concentraciones tan bajas como 1.0 nM, efectivamente impide la presentación de la

reacción acrosomal en espermatozoides previamente capacitados en presencia de concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$  (1.8 mM).

Es posible sugerir, entonces, que los mecanismos que controlan los flujos de calcio durante la capacitación difieren de los que operan al final de la capacitación e inician la RA; ya que en éste caso la regulación del transporte de calcio es sensible a la acción de las hidropiridinas y otros antagonistas, que se encuentran involucrados con el funcionamiento de los canales de calcio. Cuando estos antagonistas fueron adicionados a espermatozoides capacitados, se observó un aumento significativo en la estimulación de la reacción acrosomal. Sin embargo ésto ocurre solo cuando los espermatozoides están totalmente capacitados; las suspensiones que contenían espermatozoides parcialmente capacitados no respondieron a estos tratamientos

(Fraser y Mc Intyre, 1989). Estos resultados permiten sugerir que los canales de calcio pueden modular la ocurrencia de la reacción acrosomal, pero no de la capacitación, en los espermatozoides de algunas especies animales.

- Antipuertos  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  que utilizan la energía almacenada por el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  para intercambiar  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$ , con una estequiometría de 1:3. El antipuerto  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  es el único de estos tres sistemas que puede mover los iones de calcio en ambas direcciones; dependiendo de la dirección del gradiente de  $\text{Na}^+$ , el antipuerto es capaz de transportar  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula o hacia el exterior de la misma. Generalmente en la célula el gradiente de  $\text{Na}^+$  es grande y el  $\text{Ca}^{2+}$  tiende a ser expulsado de la célula; si el gradiente disminuye o se invierte, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  tiende a aumentar. Este mecanismo de transporte es estimulado por la presencia de ATP intracelular, normalmente formando un complejo con el  $\text{Mg}^{2+}$ . Experimentos recientes han demostrado que el funcionamiento de este antipuerto se realiza en varios pasos, por lo menos dos, iniciándose con la fijación del  $\text{Ca}^{2+}$  a la proteína transportadora que constituye el antipuerto e induciendo en ella un cambio conformacional importante, el cual se refleja en la producción de una corriente transitoria llamada  $I_{\text{conf}}$ , a la cual sigue la corriente provocada por el intercambio  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ . La proteína que constituye el antipuerto ha sido recientemente caracterizada mediante el estudio del DNA complementario, habiéndose encontrado que se trata de una proteína grande (108 kDa), que aparentemente atraviesa la membrana 12 veces y contiene un dominio intracelular importante que muestra homología con los dominio de fijación de la calmodulina (Pietrobon y col. 1990).

La carencia de evidencia que apoye el funcionamiento de canales de calcio en el espermatozoide de los mamíferos apoya indirectamente la idea de que el principal mecanismo que gobierna el transporte de calcio en estas células es el antipuerto  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ . Bajo condiciones de reposo este antipuerto funciona intercambiando  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por  $\text{Na}^+$  extracelular, el cual se encuentra en concentraciones mayores en el exterior de las células. El aumento neto de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  puede ser prevenido por la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  de la membrana plasmática del espermatozoide.

Deben considerarse también los cambios en el equilibrio transmembranal de otros iones. Los cambios en la concentración de  $\text{K}^+$  pueden ser relacionados directa-

mente con la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , siendo posible que las concentraciones altas de  $\text{K}^+$  extracelular, como se encuentran en algunas regiones del aparato genital femenino, actúen estimulando la actividad de la bomba de ATPasa y previniendo una elevación prematura de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ . En algunas especies, como el hámster, la captación de  $\text{K}^+$  parece ser un mecanismo necesario para iniciar la ocurrencia de la reacción acrosomal.

Igualmente, las modificaciones en el equilibrio de  $H^+$  intra- e  $H^+$ -extracelular parecen ser muy importantes en los eventos iniciales o en la regulación de la exocitosis. Algunos experimentos recientes parecen indicar que los cambios en el gradiente de  $H^+$ , posteriores al aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ , son indispensables para que la reacción acrosomal se manifieste óptimamente.

El funcionamiento del antipuerto  $Na^+ / Ca^{2+}$  representa un mecanismo de la mayor importancia en la fisiología normal de algunos tipos celulares. Su importancia parece residir en la necesidad que tienen varios tipos de células, de mantener baja la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  durante fases específicas de su fisiología normal. La medición directa de las corrientes eléctricas que se producen durante el funcionamiento de este antipuerto ha demostrado que su mecanismo de funcionamiento obedece a un transporte consecutivo de dos pasos, el cual transporta el  $Ca^{2+}$  a través de la membrana durante una fase de rearreglo molecular y posteriormente transloca el  $Na^+$  durante un rearreglo molecular diferente. Tal mecanismo de transporte consecutivo debe presentar dos eventos conformacionales de transición que acompañan al proceso de translocación, el cual involucra tres iones de  $Na^+$  introducidos a la célula por cada ión de  $Ca^{2+}$  acarreado hacia el exterior. Debe mencionarse también que existe evidencia de que el antipuerto  $Na^+ / Ca^{2+}$  puede funcionar, aunque en forma restringida, como un intercambiador del mismo tipo de iones; es decir intercambiando  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$  extracelulares por el mismo tipo de iones del ambiente intracelular (Slaughter y col., 1988). Es oportuno mencionar que en los miocitos cardiacos se ha determinado la presencia de ~250 antipuertos por cada  $\mu m^2$ , cada uno de los cuales recambia cerca de 2,500 veces por segundo.

La proteína obtenida del corazón que forma el antipuerto  $Na^+ / Ca^{2+}$  tiene un peso molecular aparente de 160 kDa, su funcionamiento depende de la presencia de ATP y aunque no se ha podido determinar con precisión que sea fosforilada como parte de este mecanismo de control, es posible que su funcionamiento sea modulado por fosforilación. La determinación de la secuencia de aminoácidos de la proteína ha demostrado la presencia de un sitio claro en una de las porciones intracelulares (secuencia RKAVS; amino ácidos 385-389), en donde la proteína puede ser fosforilada ya sea por una fosfocinasa dependiente de calmodulina, como por una dependiente de AMP cíclico (Slaughter y col. 1988., Reuter., 1991).

Algunas de las propiedades estructurales de esta proteína que son particularmente importantes son: es rica en tirosina (28 residuos) y triptofano (10 residuos), estos últimos distribuidos de manera sorprendentemente simétrica en los dos extremos de la molécula; es una proteína muy ácida, con 137 residuos ácidos y solamente 108 básicos (incluyendo histidinas) y

cuyo análisis de hidropatía parece indicar que cruza la membrana plasmática 12 veces (Nicoll y col., 1990).

- La presencia de bombas enzimáticas dependientes del consumo de ATP, que están encargadas de intercambiar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por protones. En este caso es también necesaria la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  para formar el conocido complejo con el ATP (Schatzman, 1985).

### **1.9 INICIO DE LA REACCION ACROSOMAL. EFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES**

A pesar de que el mecanismo de acción de las hormonas esteroides directamente sobre el genoma celular, a través de un receptor citoplásmico, o sin él, ha sido demostrado fehacientemente, existen algunos efectos rápidos de estas hormonas, que no pueden ser fácilmente explicados a través de este mecanismo genómico. Estas evidencias han originado un gran interés por la demostración de que también existe un mecanismo de acción inmediato a través de la interacción de las hormonas esteroides con la membrana celular (Meizel y Turner, 1991).

Modificaciones claras de la función membranal y la vacuolización micropinocitótica del plasmalema parecen ser acciones inmediatas resultantes de la exposición breve a la acción de los esteroides. El transporte de glucosa del eritrocito humano, que no posee la capacidad de responder a nivel genómico, es modulado por esteroides, un fenómeno similar se presenta en el espermatozoide humano (Hernández-Pérez, 1988).

El hecho de que el mecanismo de síntesis de macromoléculas se encuentra suspendido en el espermatozoide ha hecho de esta célula un modelo adecuado para estudiar esta interacción. La presencia de receptores membranales específicos para estradiol en espermatozoides humanos, sugerida por sus efectos sobre el metabolismo y la capacitación de esta célula, fue propuesta por Mercado y col. (1974), quienes también demostraron la existencia de una interacción clara de la progesterona con la membrana del espermatozoide humano, utilizando el método de apagamiento (quencheo) de la fluorescencia intrínseca del espermatozoide. Estos datos fueron comprobados más tarde (Amann y Hammerstedt, 1976), aunque en esta ocasión los resultados indicaron que la fijación de la progesterona a la membrana del espermatozoide se realizaba por un proceso no saturable y que no era posible determinar la presencia de sitios específicos de alta afinidad en los espermatozoides de bovino.

Algunos estudios recientes han reavivado el interés por la posibilidad de que las hormonas esteroideas actúen a nivel membranal, particularmente en el caso de los tejidos involucrados en la reproducción. El ovocito de *Xenopus laevis* posee un receptor membranal específico para progesterona. Este receptor ha sido demostrado utilizando progesterona unida covalentemente a la albumina sérica bovina, formando un complejo que no es capaz de atravesar la membrana plasmática (Baulieu y col., 1978)

Osman y col. (1989), sugiere que la progesterona y la  $17\alpha$  progesterona estimulan la reacción acrosomal en el espermatozoide humano. Algunos experimentos recientes (Foresta y col., 1993) han demostrado que la progesterona induce flujos de cationes monovalentes y divalentes a través de un mismo o de dos mecanismos diferentes, lo que se refleja en el hecho de que en ocasiones los flujos de  $Ca^{2+}$  pueden ser grandes en ausencia de  $Na^+$  y, en cambio los flujos de  $Na^+$  pueden ser grandes en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular (Foresta y col., 1993).

Blackmore y col. (1990), demuestra que la progesterona y la  $17\alpha$  hidroxiprogesterona estimulan el flujo de calcio a través de la membrana de los espermatozoides humanos capacitados o no capacitados. Estos reportes demuestran que ciertos esteroideos pueden iniciar un efecto biológico rápido en el espermatozoide humano y sugieren que el único modo de acción posible para este efecto requiere la presencia de receptores de superficie membranal y no puede ser fácilmente explicado en base al funcionamiento de los clásicos receptores intracelulares que requieren de la transcripción del genoma. Estos mismos autores, mencionan que el rápido incremento de calcio inducido por la progesterona en el espermatozoide puede utilizar diversos mecanismos tales como: a) apertura directa de canales de iones, b) generación de un segundo mensajero intracelular el cual a su vez abriría los canales, c) despolarización de la membrana plasmática y por consecuencia la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, d) activación de un antipuerto el cual intercambia  $Ca^{2+}$  por otros cationes intracelulares, e) liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenamientos intracelulares. Esta última posibilidad fue rechazada en este reporte. Foresta y col. (1993) presenta evidencia de que los mecanismos anteriormente mencionados pueden intervenir en el efecto de la progesterona, la cual causa una despolarización rápida de la membrana, despolarización que es incrementada por la presencia de factores quelantes.

Aunque los mecanismos de activación del espermatozoide por efecto de la progesterona no están aún totalmente claros (Blackmore y col., 1991), si está claro que se requiere la presencia de  $Ca^{2+}$  y que este ion divalente está directamente involucrado en la estimulación del

receptor membranal (¿un canal de iones?). Foresta y col. (1993) demuestra que la presencia del esteroide en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, no causa incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto demuestra que la progesterona es incapaz de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios intracelulares.

También se conoce que el ligando o receptor que opera los canales de cationes, puede admitir tanto  $\text{Ca}^{2+}$  como  $\text{Na}^+$ , y aún otros cationes monovalentes inorgánicos y orgánicos, incluyendo la colina y la metilglucamina ( Pizzo y col. 1991)

Existen fuertes evidencias que indican que los guanidin nucleótidos activados se unen a una de las llamadas proteínas "G" la cual participa en las respuestas estimuladoras de tales antagonistas y se ha sugerido que existe una proteína G tanto en espermatozoides de invertebrados como en espermatozoides de mamífero (Kopf et al. 1986).

Meizel y col. (1991), utilizando un conjugado de progesterona con albúmina sérica bovina, que seguramente no es capaz de pasar a través de la membrana plasmática, demuestra que este conjugado incrementa rápidamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e inicia la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados, lo cual demuestra que la progesterona actúa a nivel membranal y no requiere ser primeramente translocada al interior del citoplasma.

Blackmore y col. (1991) utilizando el mismo conjugado demuestra que se incrementa rápidamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior del espermatozoide humano, que el conjugado actúa como un agonista de la progesterona; y aunque es 1.5 veces menos potente que la progesterona libre, el tiempo de incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es prácticamente el mismo. Este autor señala que la respuesta mediada por la progesterona a nivel membranal responde con diferentes características a los inhibidores de la fijación de la progesterona al receptor citoplásmico, el RU38486 y ZK98.229 fueron totalmente inefectivos para inhibir el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por la progesterona. Así mismo demuestra que las progestinas sintéticas como megestrol, acetato de medroxi-progesterona, norgestrel, noretinodrel, noretindrona, R5020 y acetato de ciproterona no mimetizan los efectos de incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por la progesterona.

Los flujos de calcio reportados en estos estudios en espermatozoides de humano expuestos a progesterona muestran una respuesta global de los espermatozoides a la adición de la hormona, sin embargo, estos estudios no evalúan la respuesta individual de las células ni la localización de los sitios de unión de la hormona. Blackmore y col. (1991) usando el complejo

fluorescente  $P_4$ -BSA-FITC, muestra que la unión de este complejo en los espermatozoides eyaculados humanos se encuentra restringida a la región de la cabeza. También observa que existe una población de espermatozoides a la que no se une el complejo  $P_4$ -BSA-FITC. Un año después, Tesarik y col. (1992) muestra que solo el 10% de los espermatozoides después de la capacitación in vitro aparecían marcados con el complejo  $P_4$ -BSA-FITC y la mayoría de estas células mostraban una reacción acrosomal posterior en respuesta a la unión de la hormona. También demuestra que esos espermatozoides presentaban dos patrones de marcaje, uno de ellos caracterizado por un marcado uniforme de la región acrosomal y el otro por la restricción del marcaje a la región ecuatorial del acrosoma. En ese año Tesarik y col. (1992) relacionan la ausencia del receptor no genómico a progesterona con la presencia de infertilidad. De una manera más fina es posible correlacionar la infertilidad masculina con la presencia de sitios de unión a la  $P_4$ -BSA-FITC y midiendo los flujos de calcio con Indo 1-AM (un indicador fluorescente del  $Ca^{2+}$  libre intracelular).

En los últimos años se ha demostrado que la progesterona es capaz de iniciar el proceso de exocitosis en varias especies de mamíferos y de que en este proceso se encuentran involucrados receptores para los canales de calcio (Wistrom y Meizel, 1993): Llanos y col. (1993) lo demuestran en el hamster dorado, Shi y col. (1992) encuentran este efecto en espermatozoides de hamster Chino; Meyers y col (1993) demuestran también la acción de la progesterona para provocar exocitosis y RA en espermatozoides capacitados de cerdo.

Tesarik y Mendoza (1993) demuestran que existe un patrón característico de agregación del receptor a progesterona al unirse con su ligando, lo cual implica la existencia de un proceso de proteólisis necesario para que se realice eficientemente este evento. En el mismo año Tesarik y col. (1993) encuentran que existe una estimulación de la fosforilación de proteínas por la interacción de la progesterona con su receptor sobre la membrana del espermatozoide. Sin embargo es importante mencionar que se ha demostrado que la acción de la progesterona no parece involucrar la activación de las proteínas G (Baldi y col., 1993) pero si la activación de la fosfolipasa  $A_2$  y la síntesis de Alquil-acetil glicerofosforilcolina denominado (Factor activador de la agregación de las plaquetas, PAF) (Baldi y col., 1993).

Los resultados presentados por Baldi y col. (1993), demuestran que la incubación de espermatozoides de humano con sustancias que estimulan el transporte de calcio, fisiológicos (progesterona) o no fisiológicos (el compuesto A23187) y estimulan la reacción acrosomal, produce un incremento significativo en la producción de PAF. Estos resultados indican que la síntesis de PAF en el espermatozoide de humano se incrementa por el estímulo que induce la entrada de  $Ca^{2+}$  y que participa en la producción de la reacción acrosomal.

Turner y col.(1994) y Shi y col. (1995) reportan que la inducción de la RA por la progesterona involucra también la activación de un receptor para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Sus resultados demuestran que la progesterona estimula la exocitosis en los espermatozoides capacitados de ratón y sugieren que la acción de la progesterona es mediada por un receptor  $GABA_A$  que funciona como un receptor de superficie, estimulando el transporte de calcio. La inducción de la RA en los espermatozoides capacitados de ratón, puede ser inducida también con agonistas del receptor GABA como lo es el muscimol. Estos autores hacen énfasis en que el receptor  $GABA_A$  es diferente a los que se encuentran en las células nerviosas.

## **2. HIPOTESIS**

La expresión y distribución de sitios de unión específicos a progesterona sobre la superficie membranal del espermatozoide de conejo presenta cambios durante su paso por las diferentes regiones del epidídimo.

## **3. OBJETIVOS**

3.1 Demostrar la presencia y localización de los sitios específicos para unión de progesterona en la membrana de espermatozoides eyaculados de conejo; así como en espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo

3.2 Demostrar posibles cambios en la distribución y/o expresión de los sitios membranales de unión para progesterona en las diferentes regiones del epidídimo, que puedan ser correlacionadas con la aparición de la capacidad fertilizante del espermatozoide.

3.3 Determinar si la interacción de factores descapacitantes presentes en el plasma seminal interfieren con los sitios membranales de unión para progesterona en los espermatozoides eyaculados de conejo.

Nota: Es importante mencionar que aunque no se han caracterizado en su totalidad estos sitios de unión específicos para progesterona en el presente trabajo por comodidad de redacción también le llamaremos a este tipo de sitios de unión receptor a progesterona.

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

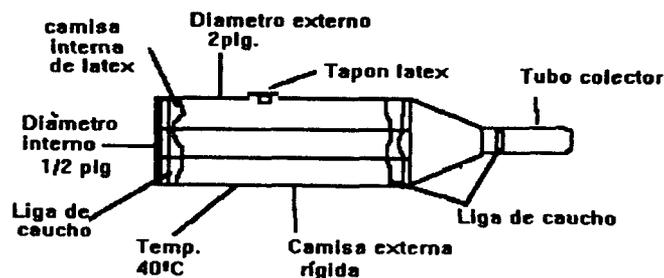
Se utilizaron conejos machos de la raza Nueva Zelanda blanco de 12-24 meses de edad, con un promedio de 3.8 kg de peso vivo con experiencia sexual y que hubieran mostrado ser fértiles. Como animales estímulo se emplearon conejas hembras adultas de la misma raza. Todos los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad Iztapalapa de la UAM, permaneciendo en sus instalaciones con temperatura controlada (12 °C), con ciclos de luz oscuridad de 14 X 10 h y mantenidos con alimento y agua ad libitum.

### 4.2 COMPUESTOS QUÍMICOS

El derivado 3-O-Carboximetiloxima de la progesterona, conjugado con albúmina sérica bovina y marcado con isotiocianato de fluoresceína (P<sub>4</sub>-BSA- FITC) así como el complejo desprovisto de progesterona (BSA-FITC) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Sn. Luis Missouri). Todos los compuestos químicos empleados fueron de grado analítico.

### 4.3 OBTENCIÓN DE SEMEN DE CONEJO

Las muestras de semen se obtuvieron con ayuda de una vagina artificial utilizando una hembra adulta como estímulo. Los machos tuvieron un entrenamiento de 15 días previo al inicio de los experimentos, el cual consistió en la introducción de la hembra estímulo a su jaula para observar su conducta e interacción sexual. La vagina artificial utilizada tiene las siguientes características:



El semen colectado se procesó dentro de un tiempo no mayor a los treinta minutos y la frecuencia de colección fué cada cuatro días. Las muestras de semen fueron diluídas con una solución bófer Biggers, Whitten y Whittingbien (BWW) modificado, libre de calcio, que contiene 95 mM NaCl, 25 mM Piruvato de Sodio, 21 mM Lactato de Sodio, 5 mM KCl y 30 mM Hepes (Sigma P.M. 238.3), ajustada a pH 7.4, se centrifugarón a 500 g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en un volumen de 3ml de solución BWW, repitiéndose la operación dos veces más.

#### **4.4 OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE CONEJO.**

Las muestras de espermatozoides se obtubieron de las regiones de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo siguiendo la técnica descrita por Heuzé y Rosado (1992). Cuatro días después de la última eyaculación, los conejos se sacrificaron por dislocación cervical, y se realizó una incisión en la parte anterolateral del cuello para eliminar la mayor cantidad de sangre. Posteriormente se realiza una incisión en el área inguinal separando el testículo y la sección inicial del conducto deferente de ambos lados, utilizando pinzas de dientes de ratón y tijeras de Mayo rectas.

Los testículos así obtenidos se depositaron en BWW en baño de hielo para evitar que se deshidraten se deberá mantener una temperatura constante durante su perfusión . El testículo y el epididimo se perfundieron por la arteria espermática con solución salina fisiológica mantenida en baño de hielo, utilizando agujas de calibre 29, según la técnica descrita por Heuzé y Rosado (1992).

Una vez perfundidos los órganos, se disecó el epidídimo eliminando el tejido adiposo que se encuentra alrededor del mismo para lo cual se utilizan unas tijeras para iris, los tejidos se bañan constantemente con BWW para mantener el tejido humedo y frío. Posteriormente el epididimo es dividió en las tres secciones anatómicas, ligando con hilo Nylon los limites entre la región de la cabeza y el cuerpo y los limites entre la parte proximal del cuerpo y la parte distal de la región de la cabeza.

El epidídimo se cortó en tres secciones, la sección de la cabeza y la cola se colocan en 3 ml de BWW libre de calcio y se mantienen en baño de hielo. Estas regiones de la cabeza y el cuerpo se liberaron de las ligaduras y se fragmentaron finamente con navaja de bisturí, resuspendiendo los fragmentos en un volumen constante de BWW (3 ml). La suspensión se hizo

pasar por una malla (previamente lavada) de 98% Nylon y 2% Licra para eliminar el tejido y utilizar los filtrados, éstos son centrifugados dos veces a 900 g y resuspendidos en 3 ml de BWW libre de calcio como lo describen Mercado y col. (1992).

La región de la cola se perfundió por el conducto deferente con 3 ml de BWW libre de calcio obteniendo los espermatozoides de esta sección lo suficientemente limpios para ser utilizados en los experimentos.

#### 4.5 EVALUACION DEL SEMEN Y LAS MUESTRAS OBTENIDAS DE EPIDIDIMO.

Todas las muestras utilizadas para los experimentos se sometieron a la siguiente evaluación según las técnicas propuestas por Belsey y col. (1980).

##### Movilidad cuantitativa.

La movilidad cuantitativa se determinó en una muestra diluida 1:200, contando 100 espermatozoides tanto móviles como inmóviles en 10 campos microscópicos elegidos al azar. La movilidad cuantitativa se expresa en por ciento a partir del número total de espermatozoides móviles contados en los 10 campos.

##### Movilidad cualitativa.

Se determinó subjetivamente por el grado de movimiento en masa que presenta la muestra, dándole una calificación arbitraria de la siguiente manera:

Muestra sin movimiento	0
Muestra con movimiento pobre	X
Muestra con movimiento progresivo bueno	XX
Muestra con movimiento progresivo excelente	XXX

Una muestra de espermatozoides eyaculados se considera como normal, cuando estos presentan movimientos progresivos entre buenos y excelentes, al observarlos en un tiempo no mayor a 2 hrs después de la eyaculación.

### Viabilidad del espermatozoide.

El número de espermatozoides vivos se determinó por la técnica de tinción supravital utilizando Eosina - Nigrosina. En una laminilla ligeramente caliente se coloca una alícuota de la muestra, adicionando dos gotas del reactivo de tinción que contiene 1% de Eosina, 5% de nigrosina y citrato de sodio al 3% disueltos en agua destilada. Con una laminilla se distribuye la muestra teñida sobre el cristal y se seca sobre una platina caliente; se cuentan 100 espermatozoides de la muestra teñida diferenciando los espermatozoides vivos de los muertos en un microscopio de luz observando a 40 X. Los espermatozoides muertos aparecen teñidos de rojo, mientras que los espermatozoides vivos permanecen sin teñir o presentan una baja coloración. El porcentaje de espermatozoides vivos en una muestra de semen normal es en promedio del 70%.

### concentración espermática

Las concentraciones espermáticas se determinaron con ayuda de un hemocitómetro estándar (cámara de Neubauer). Las muestras de espermatozoides se mezclaron perfectamente en un agitador tipo Vortex y se diluyeron a una relación 1:200 para las muestras de semen, 1:100 para las muestras de cola y 1:20 para las muestras de cabeza y cuerpo de epididimo, utilizando agua destilada, con lo cual los espermatozoides se inmovilizan y se pueden contar.

Se colocó una alícuota de la muestra diluida en cada celda del hemocitómetro, cuidando que la muestra no se desbordara hacia los canales de la cámara, se deja reposar 15 minutos para que las células se sedimenten y las células se cuentan en un microscopio de contraste de fases a una magnificación de 40x.

El número de células es calculada inicialmente en  $\text{mm}^3$ , obteniendo la concentración total en millones de células/ml multiplicando el número de células contadas X el factor de dilución X el factor de volumen.

Todas las muestras se ajustaron a una concentración de  $10^6$  cel /ml y se incubaron con el complejo de progesterona conjugada con albúmina de suero bovino y marcada con fluoresceína  $P_4$ -BSA- FITC para visualizar los sitios de unión de la  $P_4$  sobre la superficie del espermatozoide.

#### 4.6 PURIFICACION DEL COMPLEJO P<sub>4</sub>-BSA- FITC.

El complejo Progesterona 3-(O- carboximetil) oxima:BSA-Isotiocianato de fluoresceina (P<sub>4</sub>-BSA- FITC) se trató con una suspensión de carbón-Dextran a fin de adsorber la progesterona que se hubiera liberado espontáneamente del complejo.

El carbón activado (NORIT-A, MERCK.Co.) que se utilizó fué previamente purificado, neutralizado y activado de acuerdo al siguiente procedimiento.

- a) 100 g de NORIT-A se suspendieron en 500ml de HCl 0.1 N agitando constantemente con una varilla de vidrio durante 15min.
- b) La suspensión se centrifugó a 5000 rpm /5 min y se decantó el sobrenadante; el carbón se resuspendió en 500 ml de agua destilada, se agitó durante 15 min y se centrifugó a 5000 rpm / 5min decantando el sobrenadante.
- c) El carbón se resuspendió en 500ml de una solución de NaOH 0.1 N se centrifugó a 5000 rpm/ 5 min y se decantó el sobrenadante.
- d) Se realizaron lavados con 500 ml de agua destilada centrifugando cada vez hasta que el agua de lavado tenga un pH neutro.
- e) En una mufla se activa a 300°C durante 5hrs conservándose posteriormente en un desecador hasta su utilización.

La suspensión de carbón-Dextran se preparó con 60 mg de NORIT, 6 mg de Dextran T-70 (PM 70,000) disuelta en 100 ml de BWW. Esta suspensión se agita constantemente con un agitador magnético a 4°C (cuarto frío), y se toman alícuotas de 5 ml que se agregan a la P<sub>4</sub>-BSA- FITC (5-10 mol de P<sub>4</sub>/ mol de BSA y 2-5 mol de FITC / mol de P<sub>4</sub>-BSA), que se mantiene en agitación constante por medio de un agitador magnético durante 24 hrs a 4°C y posteriormente se centrifuga a 48,000 g por 90 min. a 2°C.

El precipitado resultante contenía la progesterona libre adsorbida por el carbón-cubierto por Dextran. El sobrenadante que contiene el complejo P<sub>4</sub>-BSA- FITC se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones con el objeto de eliminar cualquier residuo de carbón-Dextran que no se hubiere sedimentado durante la primera centrifugación. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 1.5 ml que se almacenaron a -21°C.

El contenido de proteínas (BSA) del sobrenadante se determinó por medio de absorción de UV en un espectrofotómetro a 279 nm y como referencia se considera que la  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 6.67$  equivale a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración final del complejo en el medio fue de 10  $\mu\text{g P}_4\text{-BSA-FITC}$  que corresponden a  $\approx 2\mu\text{mol}$  de progesterona.

En los grupos control se utilizó un complejo desprovisto de progesterona (BSA-FITC) que contenía de 2 a 5 mol de FITC / mol de BSA. Este control fue sometido al mismo proceso de purificación que el complejo con  $\text{P}_4$ .

#### **4.7 INCUBACION CON EL COMPLEJO $\text{P}_4\text{-BSA-FITC}$ .**

De las muestras de cada región del epididimo y de las muestras de espermatozoides eyaculados ajustadas a  $10^6$  células / ml se tomaron alicuotas de 300  $\mu\text{l}$  por triplicado, se centrifugaron a 500g durante 5 min y se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de BWW que contenía el complejo  $\text{P}_4\text{-BSA-FITC}$  o BSA-FITC.

Posteriormente las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min y se lavaron con BWW libre de calcio 2 veces, centrifugando cada vez a 500g durante 5 min, para eliminar el complejo que no se unió a la superficie celular.

Posteriormente se realizarón frotis por triplicado contratiñendolos con Eosina-Nigrosina de acuerdo a la tecnica descrita anteriormente. Los frotis fueron observados en un microscopio de epifluorescencia (ZEISS III RS ), utilizando un filtro de banda ancha (BP 450-490, LP 52O). Se tomaron fotografias de las muestras de las diferentes regiones del epididimo y de los espermatozoides eyaculados y se calculó el porcentaje de espermatozoides marcados con un patrón específico de acuerdo al tipo de muestra y al estadio de maduración espermática. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

## 5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados muestran patrones diferentes de fluorescencia para los espermatozoides obtenidos de las distintas regiones del epididimo (cabeza, cuerpo, cola) y también en los espermatozoides obtenidos por eyaculación.

Los espermatozoides de las regiones estudiadas muestran diferencias específicas en la distribución de la fluorescencia las cuales se describen a continuación.

### 5.1 PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE LA REGION DE LA CABEZA DEL EPIDIDIMO

La fluorescencia observada en los espermatozoides colectados de la región de la cabeza del epididimo una distribución difusa en la cabeza del espermatozoide, con tendencia a concentrarse hacia la región ecuatorial de la misma, formando una banda de fluorescencia en esta región, se observó además fluorescencia en la región acrosomal y post acrosomal hacia la base de la cabeza donde se implanta el flagelo.

Todos los espermatozoides marcados muestran fluorescencia en la región de la pieza media de la cola. Fig. 1, 2.



Fig.1

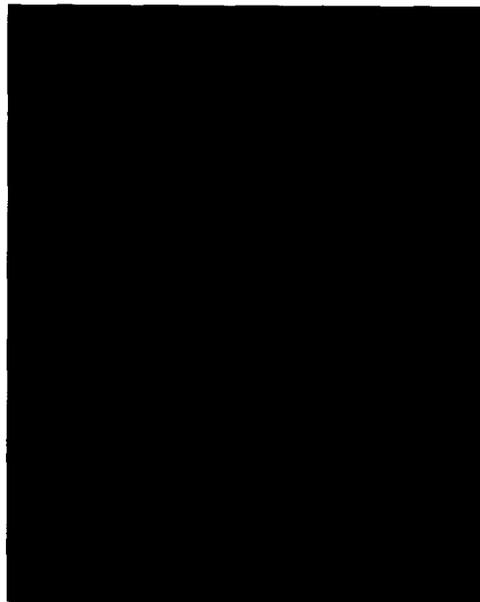


Fig.2

## 5.2 PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DELA REGION DEL CUERPO DEL EPIDIDIMO

Los espermatozoides de la región del cuerpo del epididimo incubados con P<sub>4</sub>-BSA-FITC muestran un patrón característico de agregación de la fluorescencia, formando parches en la región del acrosoma. Este patrón de fijación de la progesterona es diferente al observado en los espermatozoides obtenidos de las otras dos regiones del epidídimo. Es también posible observar puntos fluorescentes hacia la región ecuatorial. La formación de agregados o parches que muestran un posible reacomodo del receptor a progesterona son similares a los descritos por Tesarik et al (1993), sin embargo nuestros experimentos no nos permiten asegurar que existe un movimiento del receptor como consecuencia de la unión del conjugado P<sub>4</sub>-BSA-FITC.

En los espermatozoides que presentaron marcas fluorescentes se observó también la presencia de fluorescencia en la pieza media de la cola, Fig. 3. Es importante mencionar que los espermatozoides obtenidos de esta región del epididimo incubados con BSA-FITC sin progesterona como grupo control no presentan habitualmente ninguna fluorescencia y los que presentan fluorescencia lo hacen en forma difusa observándose solo una sombra de fluorescencia a lo largo de la membrana del espermatozoide.



Fig.3

### 5.3 PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DELA REGION DE LA COLA DEL EPIDIDIMO

Los espermatozoides obtenidos de la región de la cola del epididimo incubados con P<sub>4</sub>-BSA-FITC, muestran un patrón de fluorescencia que difiere en mucho con los patrones descritos en los espermatozoides obtenidos de otras regiones del epididimo y con los patrones de fluorescencia descritos por Tesarik et al. (1992, 1993) para los espermatozoides capacitados de humano. Los espermatozoides de la región de la cola del epididimo muestra una agregación de la fluorescencia hacia la región anterior del acrosoma formando una banda fluorescente que delinea claramente el acrosoma, dejándose de observar la banda de fluorescencia en la región ecuatorial que se encontró en los espermatozoides de las regiones de la cabeza del epididimo, es importante mencionar que también los espermatozoides de esta región del epididimo presentan fluorescencia en la pieza media de la cola del espermatozoide Figs.4, 5.

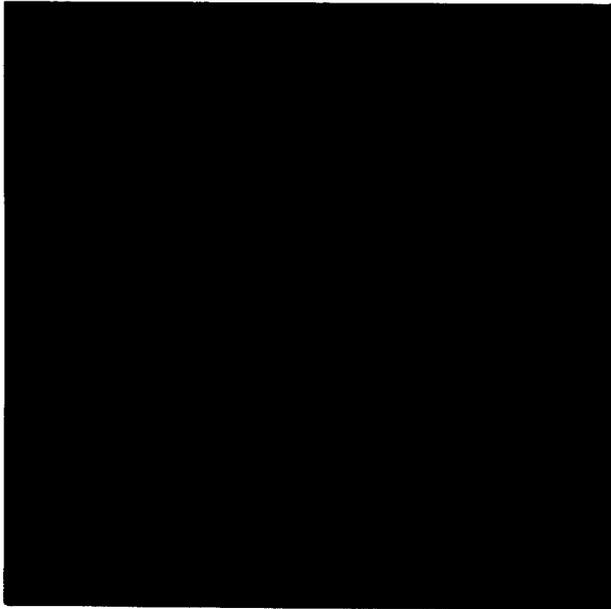


Fig. 4

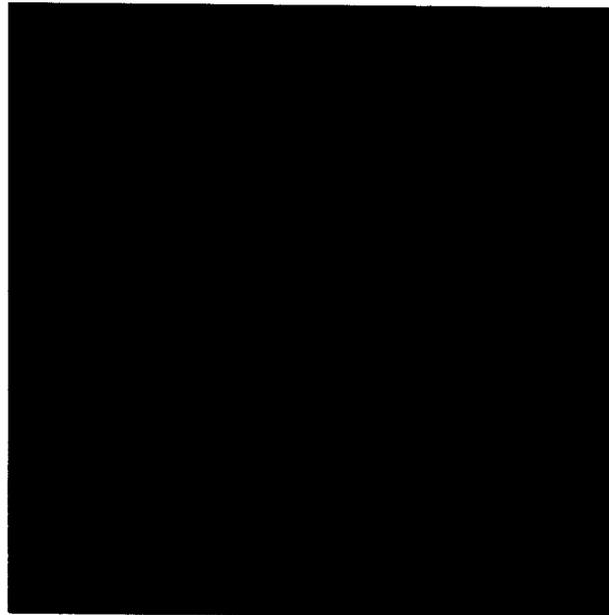


Fig.5

#### 5.4 PATRON DE FLUORESCENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS POR EYACULACION

Los espermatozoides obtenidos por eyaculación e incubados con  $P_4$ -BSA-FITC, muestran un patrón de fluorescencia que difiere totalmente de los espermatozoides obtenidos de la región de la cola. Estos presentan nuevamente fluorescencia que se distribuye en toda el área acrosomal sin presentarse agregados en la región anterior del acrosoma como lo presentan los espermatozoides de la región de la cola del epididimo, tampoco se observan parches como los encontrados en el área acrosomal de los espermatozoides obtenidos del cuerpo del epididimo.

Es importante hacer notar, que se sigue observando fluorescencia bien definida en la pieza media de la cola en todos los espermatozoides observados. Fig.6.

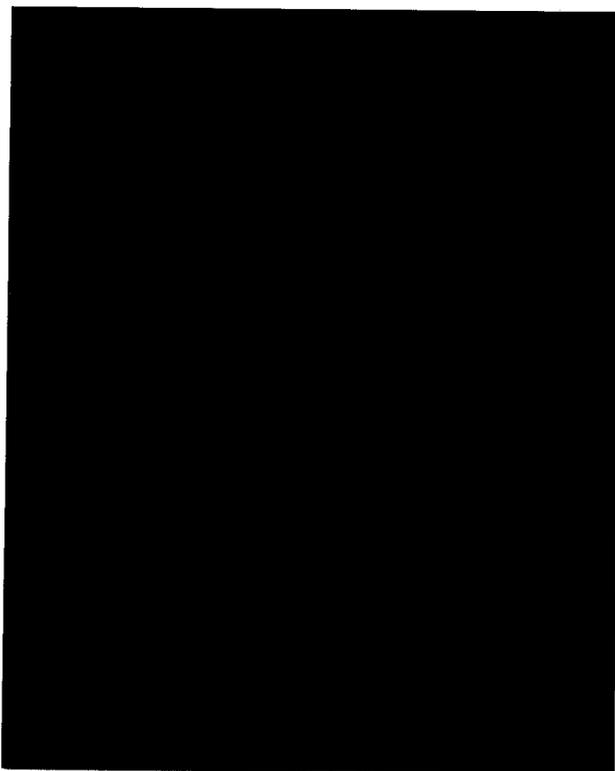


Fig. 6.

### 5.5 GRUPOS CONTROL.

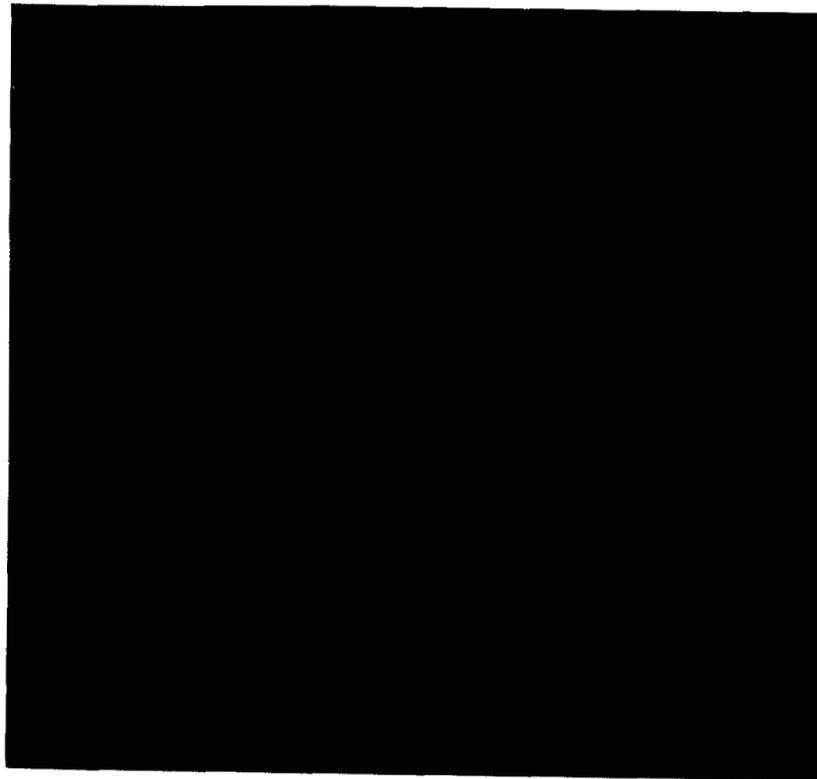
En todos los experimentos realizados, se tomaron muestras que fueron incubadas con BSA-FITC, sin progesterona, las cuales sirvieron como grupos control para cada experimento. En dichas muestras no se encontró normalmente ninguna fluorescencia apreciable y cuando existió ésta fué poco notable y difusa, mostrándose habitualmente sobre todo el contorno de la membrana de los espermatozoides, sin mostrar agregaciones o parches ni patrón específico de fijación y por lo mismo no hubo, en estos casos, ninguna diferencia entre los espermatozoides de las diferentes regiones estudiadas. Fig 7.

Control  
Cabeza

Control  
Cuerpo

Control  
Cola

Control  
Eyaculado



### 5.6 EVALUACION DE LOS ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS TEÑIDOS CON P<sub>4</sub>-BSA- FITC.

Las muestras observadas en el microscopio de epifluorescencia, fueron analizadas contabilizando las células que fueron marcadas con el complejo P<sub>4</sub>-BSA-FITC y aquellas en que no hubo unión de dicho complejo, diferenciando de estas últimas las células que estaban muertas y las que estaban vivas pero que no presentaron unión durante la incubación con el complejo.

Todas las muestras fueron teñidas por la técnica de tinción supravital Eosina-Nigrosina con el fin de diferenciar los espermatozoides vivos y muertos y sus características de fluorescencia. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los cuatro experimentos realizados, así como el análisis estadístico de todas las muestras incluidas en este trabajo.

#### EXPERIMENTO No. 1

REGION	ESPERMATOZOIDES, POR CIENTO		
	Marcados	No marcados, vivos	No marcados, muertos
Cabeza	66	1	33
Cuerpo	54	17	29
Cola	72	12	16
Eyaculados	57	12	31

#### EXPERIMENTO No. 2

REGION	ESPERMATOZOIDES, POR CIENTO		
	Marcados	No marcados, vivos	No marcados, muertos
Cabeza	82	2	16
Cuerpo	56	7	37
Cola	84	4	12
Eyaculados	62	7	31

**EXPERIMENTO No. 3**

REGION	ESPERMATOZOIDES, POR CIENTO		
	Marcados	No marcados, vivos	No marcados, muertos
Cabeza	76	7	17
Cuerpo	47	4	39
Cola	81	7	12
Eyaculados	66	4	30

**EXPERIMENTO No. 4**

REGION	ESPERMATOZOIDES, POR CIENTO		
	Marcados	No marcados, vivos	No marcados, muertos
Cabeza	79	5	16
Cuerpo	58	14	28
Cola	81	5	14
Eyaculados	63	16	21

## 6. DISCUSION.

Hasta hace poco se había pensado que la gran mayoría, si no es que la totalidad, de los efectos que tienen las hormonas esteroides sobre los sistemas vivos son mediados a través de receptores citoplásmicos y nucleares específicos. Según este concepto la interacción del complejo esteroide/receptor con el DNA actuaba invariablemente a través de la modificación de la actividad transcripcional de las células blanco. Sin embargo, en los últimos 10 años, se ha presentado un número creciente e importante de evidencias experimentales que demuestran la existencia de efectos rápidos de algunas hormonas esteroides, los cuales no son fácilmente interpretables por medio del sistema clásico de interacción mencionado arriba. Tales evidencias comprenden una creciente variedad de estirpes celulares: neuronas, hepatocitos (Sanchez-Bueno y col, 1991), y espermatozoides (Osman y col, 1989) entre otras estirpes celulares.

Puesto que su mecanismo de transcripción y traducción de la información genética se encuentra detenido, las células espermáticas se consideran en la actualidad como un modelo particularmente útil en la demostración de que los efectos rápidos de las hormonas esteroides sobre estas células son realizados a través de su interacción con receptores membranales específicos (Blackmore y col., 1990; Meizel y col., 1990; Tesarik y col., 1992).

Sin embargo, inicialmente el sitio de acción de la progesterona para realizar estas acciones fué motivo de duda. En efecto, debido a su naturaleza hidrofóbica, la progesterona puede atravesar fácilmente la membrana plasmática, de manera que es concebible que su actividad se realice a través de mecanismos intracelulares y no membranales. Era pues indispensable demostrar, de manera objetiva, a que nivel se regulaba en las células espermáticas la estimulación del transporte de  $Ca^{2+}$  por la progesterona.

Se ha propuesto que cuando se sospeche que un ligando puede actuar a través de su fijación a receptores membranales, la demostración de tal mecanismo puede realizarse mediante el uso de ligandos inmobilizados, es decir, mediante la fijación química de la molécula efectora a moléculas que por sus características fisico-químicas y su tamaño son claramente incapaces de penetrar al interior de las células. Debe tenerse presente, sin embargo, que la fijación del ligando a la molécula inmobilizadora debe realizarse de tal modo que no interfiera con su capacidad de fijarse al receptor membranal, conservando la eficiencia, la especificidad y la funcionalidad de la interacción. Numerosos experimentos realizados utilizando esta técnica de ligando inmobilizado, han demostrado que la actividad de la progesterona sobre la captación de

$\text{Ca}^{2+}$  por el espermatozoide humano se realiza sin ninguna diferencia cuando la progesterona se adiciona libre, que cuando la progesterona se adiciona unida covalentemente por medio de un radical O-carboxi-metiloxima formando un enlace entre la posición 3 de la progesterona y la albumina sérica bovina (Tesarik y Mendoza, 1993).

La utilización de esta técnica del conjugado sintético albúmina-progesterona, pero adicionado de la presencia de un trazador fluorescente (isotiocianato de fluoresceína), ha permitido identificar la localización del receptor membranal (Tesarik y col., 1992) sobre la membrana plasmática que cubre la región acrosomal del espermatozoide humano, sin que hasta el momento se haya establecido, en las células espermáticas de otras especies animales, si la distribución del receptor membranal a progesterona es semejante.

Nuestros resultados presentan, por primera vez, la visualización de la distribución del receptor a progesterona sobre la superficie de los espermatozoides eyaculados de una especie animal diferente al humano. Es posible observar que, en el conejo, los espermatozoides obtenidos por eyaculación e incubados con  $\text{P}_4$ -BSA-FITC, muestran un patrón de fluorescencia localizado sustancialmente en toda el área acrosomal sin presentarse agregados en la región anterior del acrosoma, ni tampoco, sino excepcionalmente, sobre la región ecuatorial de la cabeza. Es importante hacer notar, que en el caso de los espermatozoides de conejo se observa, en todos los espermatozoides eyaculados estudiados, fluorescencia bien definida en la porción basal de la cabeza y en la pieza media, lo cual no sucede en el caso del espermatozoide humano (Tesarik y col., 1992, 1993).

Estudios recientes han demostrado que la progesterona es capaz de inducir la reacción acrosomal en espermatozoides de diferentes especies animales. Hasta ahora se ha demostrado que la progesterona puede iniciar la exocitosis en el humano (Osman y col., 1989; Meizel y col., 1991; Tesarik y col., 1992), en el hamster dorado (Llanos y col., 1993), en el caballo (Meyers y col., 1993) y en el cerdo (Meléndrez y col., 1993). También se ha demostrado que este esteroide, y algunos de sus derivados como la  $\alpha$ -hidroxi progesterona, inducen una rápida captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los espermatozoides de estas especies animales, tanto capacitados como no capacitados (Blackmore y col., 1990; Meizel y col., 1990; Tesarik col., 1992).

En los resultados presentados en el presente trabajo, demostramos primeramente que la progesterona se une selectivamente a la membrana de los espermatozoides de conejo en forma parecida a la descrita en los espermatozoides de humano (Tesarik col., 1992). Así mismo este trabajo demuestra que el receptor a progesterona existe y es capaz de unir a la progesterona

desde que el espermatozoide entra a la región de la cabeza del epidídimo. La presencia del receptor en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola, sugiere que la expresión de dicho receptor y su localización en la superficie de la célula espermática constituye parte del proceso de la espermatogénesis en sí y no forma parte del proceso de maduración del espermatozoide en el epidídimo.

Sin embargo, nuestros datos indican que la distribución de dicho receptor sobre la superficie espermática si es sustancialmente modificada durante el paso de los espermatozoides por el conducto epididimario y que dicha redistribución forma parte del proceso de maduración que experimenta el espermatozoide durante su transcurso a través del conducto epididimario y que finalmente se traduce en la adquisición por la gameta masculina de la funcionalidad que le permitirá realizar exitosamente su papel en la fertilización del ovocito. El patrón de fijación observado en el cuerpo del epidídimo muestra que existe un re-acomodo de los receptores, éstos al parecer se desplazan hacia la parte anterior del acrosoma durante el paso del espermatozoide de la región de la cabeza a la región media del epidídimo. De la misma manera, las fases tardías del proceso de maduración epididimaria involucran un nuevo reacomodo de los receptores a progesterona en la superficie del espermatozoide, de manera que en las células localizadas en la cabeza del epidídimo la distribución del receptor se hace altamente localizada y específica a la región periacrosomal.

Es posible que los cambios en la distribución del receptor sobre la membrana del espermatozoide, durante su paso a lo largo del epidídimo, esté relacionada con la capacidad que tienen los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo para acumular selectivamente calcio de fuentes exógenas. Se sabe que uno de los mecanismos por los cuales los receptores membranales cumplen su función reguladora sobre el proceso de generación de señales iniciadas por la formación del complejo receptor/ligando, consiste en la agregación de los receptores en regiones específicas de la superficie celular. Con base en estas observaciones se ha propuesto recientemente que el mecanismo de acción de la progesterona como inductora de la exocitosis que acompaña la producción de la reacción acrosomal en los espermatozoides de algunas especies de mamíferos, depende también de la redistribución de los receptores membranales para formar agregados o "patches" en regiones específicas de la superficie acrosomal de la célula espermática (Tesarik y col., 1992a; Tesarik y Mendoza, 1993).

Nuestros resultados demuestran que una de las características de los espermatozoides obtenidos de la región media (cuerpo) del epidídimo de conejo es la agregación del receptor en forma de parches. Si se compara este patrón de fijación del esteroide con el observado en las

gametas aisladas de la cabeza del conducto epididimario, es evidente que la distribución en parches o aglomerados de los receptores debe obedecer a un proceso de reacomodo del receptor a progesterona que acontece durante el desarrollo del proceso de maduración del espermatozoide en el epidídimo, este tipo de agregación podría ser un mecanismo de control para la entrada y salida de calcio que se ha demostrado ser diferentes en las diferentes etapas del proceso de maduración.

Según esto, podríamos sugerir que la distribución difusa del receptor a progesterona sobre la región acrosomal de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo podría permitir una mayor capacidad para captar calcio como lo describe Vijagraghavan y col. (1989). En efecto, en 1989 Vijagraghavan y col. describe que la acumulación de calcio de fuentes exógenas en espermatozoides inmaduros de cabeza de epidídimo llega a ser hasta 4 veces mayor que el observado en espermatozoides aislados de la cola de este conducto. Sin embargo debemos decir que según los experimentos de este investigador, la acumulación de calcio en las células obtenidas de esta región del epidídimo requiere la presencia de lactato como sustrato exógeno y por lo tanto será particularmente importante para el mantenimiento de las funciones vitales de las gametas. Por otro lado, es posible proponer que la distribución en aglomerados, que se presenta característicamente en los espermatozoides de cuerpo de epidídimo, aunque reduce la captación total de calcio por el espermatozoide, le da mayor selectividad al proceso. Siguiendo este marco de pensamientos, sería posible sugerir que la distribución selectiva del receptor a la progesterona, estrictamente en el acrosoma, de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo, constituye la etapa final de maduración de este proceso de regulación del transporte de calcio, circunscribiendo el proceso estrictamente a la región periacrosomal.

La fluorescencia encontrada en la pieza media de la cola del espermatozoide obtenido de cualquiera de las diferentes regiones del epidídimo, así como en los espermatozoides obtenidos por eyaculación, podría tener relación con los procesos de acumulación y excreción de calcio necesarios para el metabolismo energético general de la célula espermática. Esta conclusión podría ser fácilmente sustentada en los siguientes hechos: a) la estrecha relación de las membranas mitocondriales con la membrana plasmática en la célula espermática; b) existe bastante evidencia de que el incremento intracelular de calcio en la gameta masculina es dependiente de la presencia de sustratos naturales exógenos tales como el ácido láctico (Yanagimachi, 1994); c) a este punto debe agregarse el hecho de que la localización de la isoenzima llamada X de la deshidrogenasa láctica (LDH-X) es de localización mitocondrial y que se ha demostrado que la actividad de esta enzima, específica del espermatozoide en los mamíferos, tiene relación con la acumulación de calcio; d) se ha demostrado que el estado

redox de los piridin nucleótidos mitocondriales funciona como un eficiente mecanismo regulador de la entrada y salida de calcio (Hammer, 1973; Yanagimachi, 1994); e) finalmente, se ha demostrado (Babcock y col., 1976), en espermatozoides maduros obtenidos de la región terminal del epidídimo, el transporte de importantes cantidades de calcio que se acumulan intracelularmente cuando las células espermáticas son suspendidos en bófers que contienen calcio. Esta entrada de calcio al espermatozoide es fundamentalmente determinada por la actividad mitocondrial (Babcock y col., 1978)..

Finalmente quisiéramos proponer que los cambios observados en la distribución del receptor a progesterona cuando las células espermáticas entran en contacto con la secreción de las glándulas accesorias, en el momento de la eyaculación, se debe fundamentalmente al recubrimiento de la superficie espermática, principalmente de su región acrosomal anterior, por los factores llamados descapacitantes. La adhesión de estos factores a la membrana plasmática del espermatozoide impide que el espermatozoide recién eyaculado pueda experimentar la excitosis que acompaña a la reacción acrosomal. Es bien sabido que para que la reacción acrosomal pueda realizarse normalmente después de la eyaculación, es preciso que ocurra con anterioridad el proceso llamado de capacitación (Coetzee y col, 1990; Fraser y Monks, 1990, Yanagimachi, 1994) el cual requiere, como parte del proceso normal, el desprendimiento de algunas sustancias de estructura proteica que se han fijado a la membrana del espermatozoide durante su contacto con el fluido seminal.

También se ha propuesto que la capacitación involucra la facilitación de los mecanismos de captación de calcio por el espermatozoide, los cuales serán indispensables durante el desarrollo de la reacción acrosomal (Fraser y col., 1984; Hernández- Pérez y Rosado, 1988; Yanagimachi, 1994). Rufo y col. (1982), estudiando el proceso de descapitación en los espermatozoides de toro encontró que mientras los espermatozoides epididimarios de toro tienen la capacidad de acumular calcio rápidamente, los espermatozoides eyaculados no lo hacen así. Este mismo autor, (Rufo y col., 1982) aisló del plasma seminal del bovino una proteína, llamada caltrina, que funciona como inhibidor del transporte de calcio, modulando el intercambio  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  y que podría funcionar como factor descapacitante.

En conclusión, nuestros resultados demuestran, por primera vez, el patrón de distribución de los receptores a progesterona sobre la superficie membranal de los espermatozoides eyaculados de una especie de mamíferos diferentes al hombre, los lagomorfos, comprobando algunos hallazgos anteriores sobre la participación de la interacción

progestágeno / membrana espermática como parte de los procesos de capacitación y de reacción acrosomal.

También por primera vez, en cualquier especie animal, se demuestra la presencia de este tipo de receptores en los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, así como los cambios de distribución que experimentan estos receptores durante el proceso de maduración epididimaria. Se propone que estos cambios de distribución de los receptores a progesterona pueden obedecer a los cambios en los mecanismos de transporte de calcio que ocurren durante este mismo proceso de maduración del espermatozoide.

Finalmente, se propone también que, durante el proceso de la eyaculación, la fijación de los llamados factores descapacitantes, oculta o enmascara los receptores membranales a progesterona y que será necesario que estos factores descapacitantes se desprendan de la superficie espermática para que puedan llevarse a cabo normalmente los procesos de capacitación y reacción acrosomal que involucran, de manera muy importante, el transporte eficiente de iones de calcio a través de la membrana acrosomal.

Recientemente se ha sugerido que el receptor a progesterona sobre la superficie de la membrana tal vez involucra un receptor GABA (Shi et al, 1995). Estos estudios han resaltado la funcionalidad y existencia del receptor a progesterona en espermatozoides que han pasado por un proceso de maduración.

**7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Agostino D., Jones R., White R., Parker M.G. (1980) Androgenic regulation of messenger RNA in rat epididymis. *Biochem. J.* 190:505.
- Amann L., Hammerstedt R.H. (1976) Bind of steroids by intact bovine sperm. *Biol. Reprod.* 15:670.
- Ashraff M., Peterson R.N., Rusell L.D. (1982) Activity and location of cation-dependent ATPases on the plasma membrane of boar spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107:1273.
- Austin C.R. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in fallopian tubes. *Nature* 168:997.
- Babcock D.F., First N.L., Lardy H. A. (1976) Action of ionophore A23187 at the cellular level separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *J. Biol.Chem.* 251:3881.
- Babcock D.F., Stramerjon D.M., Hutchinso T. (1978) Calcium distribution in individual cells correlated With ionophore action on motility. *J. Exp. Zool.* 206:391-400.
- Babcock D.F. (1983) Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by nort point measurements employing the fluorescein cromophore. *J. Biol. Chem.* 258:6380.
- Babcock D.F., Pfeiffer D.R. (1987) Independent elevation of cytosolic  $[Ca^{++}]$  and pH of mammalian sperm by voltage - dependent and pH-sensitive mechanisms. *J. Biol. Chem.* 262:15041.
- Baldi E., Fiseti C., Krausz C., (1993) Stimulation of platelet- activating factor syntesis by progesterone and A23187 in human spermatozoa. *Biochem J.* 292:209.
- Ballesteros L.M. Delgado N.M., Rosado A., Hernández- Pérez O. (1983) Effect of steroid hormones on membrane sugar transport in human spermatozoa. *Arch. Androl.* 11:95.
- Baulieu E.E., Godeau F., Schordoret M., Schardoret- Slatkine S. (1978) Steroid induced meioic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature* 275 :19.
- Belsey M.A., Moghissi K.S., Eliason R., Paulsen C.A., Gallegos A., Prasad M.R.N. (1980) *Laboratory Manual for the Examination of Human semen- Cervical Mucus Interaction.* Published By Press Concern Singapore.
- Blackmore P.F., Beebe S.J., Danforth D.R., Alexander N. (1990) Progesterone and 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterone. Novel simulators of calcium influx in human sperm *J. Biol. Chem.* 265 :1376.
- Blackmore P. F., Neulen J., Lattanzio, Stephen J., Beebe J. (1991) Cell surface- binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* 266:18655.

- Boué F., Sullivan R. (1993) Human epididymal sperm protein involved in fertilization. *Biol. Reprod.* 48.supp. 1 (Abstr).
- Brand H., Acott., Johnson D., Hoskins D. (1978) Evidence for an epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol. Reprod.* 19:830-835.
- Brooks D.E., Tiver K. (1983) Localization of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 69:651.
- Carr D.W., Acott T.S. (1984) Inhibition of Bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of sperm motility quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30:913.
- Carr D.W., Acott T.S. (1989) Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod.* 41:907.
- Cittadini A., Dani A.M., Wolf F., Bossi D. Calviello G (1982) Calcium permeability of Ehrlich ascites tumor cell plasma membrane in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 686:27.
- Coetzee K., Swanson J. Kruger T.F. (1990) Hamster Zone-free Oocyte Spermatozoa penetration assay. En: *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*, A.A. Acosta, S.B. Swanson, T.F. Kruger, Williams & Wilkins Eds. p.p. 119.
- Cross N.L., Overstreet I.W. (1987) Glycoconjugates of the human sperm surface distribution and alterations that accompany capacitation *in vitro*. *Gamete. Res.* 16:23.
- Davis BK. (1976) Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152:257.
- Duval S. D., F. Homo-Delarche (1983) Non genomic effects of steroids, interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 737:409.
- Eddy E.M. (1988) The spermatozoon En: *Physiology of reproduction* E. Knobil, D.J. Neill, L.L. Ewing, C.L. Marker, Eds. Raven Press New York pp. 27-68.
- Eddy E.M., O'Brien DA (1994) The spermatozoon. En: *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil, D.J. Neill, L.L. Ewing, C.L. Marker, Eds., Raven Press, New York, pp. 29-33.
- Evans R.W., Setchell B.P. (1979) Lipid changes in the boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis. *J. Reprod. Fertil.* 57:149.
- Feinberg J., Pariset C.C., Rondard., Luir M., Lanneau M., Weinman S., Demaille J. (1983). Evolution of  $Ca^{2+}$  and cAMP - dependent regulatory mechanisms during ram spermatogenesis. *Dev. Biol.* 100:260.
- Foresta C., Rossato M., Di Virgilio F. (1993) Ion fluxes through the progesterone-activated channel of the sperm plasma membrane. *Bioch. J.* 294:279.
- Fraser L.R. (1984) Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of surface-associated inhibitory component. *J. Reprod. Fertil.* 72: 373.
- Fraser L.R., Ahuja K.K. (1988) Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res* 20:491.

- Fraser L.R., Mc Intyre K. (1989) Calcium channels antagonists on the acrosome reaction but no capacitation in mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 86:223.
- Fraser L. R., Monks N.J. (1990) Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation *J. Reprod. Fertil. Suppl* 1, 42:9.
- Frelin C., Vigne P., Ladoux A.,Lazdunski M. (1988) The regulation of the internal pH in cells from vertebrates. *European J. Biochem.* 174:3.
- Gaets J.E., Pertchuk L.P., (1979) Synthesis of fluorescein labelled steroid hormone - albumin conjugates for the fluorescent histochemical detection of hormone receptors. *J. Steroid. Biochem.* 13:1001.
- Garbes D.L., Firs N.L., Lardy H. A. (1973) Properties of adenosine 3', 5'- monophosphate dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. *J.Biol. Chem.* 248:875.
- Garbers D.L. y Kopf, G. S. (1980) The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13:251.
- García R., Martínez R., Rábago M.,Hernández-Pérez O., Reyes A., Rosado A. (1991) Subcellular distribution of phospholipase A2 and ATPases during capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Arch. Androl.* 26:93.
- Gatti J.L., Cheverier C., Paquignon M., Dacheux J.L. (1993) External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*98:439.
- Gordon M., Dadekar P.V., Eager P.R. (1978) Identification of phosphatases on the membranes of guinea pig sperm. *Anat. Rec.* 191:123.
- Hammerstedt R.H., Keith A.D., Boltz R.C., Todd P.W. (1979 ) Use of amphiphilic spin labels and whole cell isoelectric focusing to assay charge characteristics of sperm surfaces. *Arch. Biochem. Biophys.* 194: 565.
- Hammerstedt R.H., Hay SR., Amann R.P.(1982) Modifications of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 27:745.
- Hamner C.E. (1973) Oviductal fluid composition and physiology *En:Hand Book of Physiology.* R.O.Greep, E.B. Astwood.Eds., sec. 7 Endocrinology. Vol II. Washinton, pp. 141- 151.
- Hernández-Pérez O., Rosado A. (1988) Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia* 39:249.
- Hicks J.J., Martínez-Manautou J., Pedrón N., Rosado A. (1972) Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. *Fertil. Steril.* 23:172.
- Hicks J.J., Pedrón N., Rosado A. (1972) Modifications of the human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. *Fertil. Steril;* 23:886.
- Holz H. M. (1990) Filtros Optimos para FITC. *En:Lo que deberia saberse sobre la microscopia de fluorescencia.* H.M. Holz Ed. West Germany 4º Edicion Alemania Occ. p.p.

- Horowitz J.A., Toeg H., Orr G.A. (1984) Characterization and localization of cAMP-dependent protein kinases in rat caudal epididymal sperm. *J. Biol. Chem.* 259, 832.
- Hoskins D.D., Casillas E.R., Stepens D.T. (1972). Cyclic AMP dependent protein kinase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:1331.
- Hoskins D.D., Acott., Critchlow I., Vijayaraghavan S. (1983) Studies on the role of cyclic AMP and calcium in the development of bovine sperm motility. *J. Submicroscopy and Cytology* 15:21.
- Huajuca L., Delgado N.M., Merchant L.H., Panardo R.M., Rosado A. (1977) Cyclic AMP induced incorporation of <sup>33</sup>P into human sperm membrane components. *Biol. Reprod.* 17:89.
- Hyne R.V., Higson R.E., Kohlman D., Lopata A. (1984) Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea pig acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 60:83.
- Hyne R.V., Garbes D.L. (1979) Calcium dependent increase in adenosine 3'5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5699.
- Jones R., Brown C. (1982) Association of epididymal secretory proteins showing  $\alpha$ -lactalbumin-like activity with the plasma membrane of rat spermatozoa. *Biochemistry* 20:161.
- Klinefelter G.R., Hamilton D.W. (1984) Organ culture of rat caput epididymal tubules in a perfusion chamber *J. Androl* 5:243-258.
- Klinefelter G.R., Hamilton D.W. (1985) Synthesis and secretion of proteins by perfused caput epididymal tubules, and association of secreted proteins with spermatozoa. *Biol. Reprod.* 33:1017-1027.
- Kopf G.S., Garbes D.L. (1980) Calcium and fucose sulfate- rich polymer regulate sperm cyclic nucleotide metabolism and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 22:1118.
- Kopf G.S., Woolkails M.J., Gerton G.L. (1986) Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 261 :7327.
- Landry J., Lehninger A.L. (1976) Transport of calcium ions by Ehrlich ascites tumor cell. *Biochem J.* 158:427.
- Langlais J., Kan F.W.K., Granger L., Raymon I., Bleau G., Roberts K.D. (1988) Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during ~~in vitro~~ capacitation. *Gamete Res.*, 20:185.
- Lee, M.A., Check J.H., Kopf G.S. (1992) A guanidine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 31:78.
- Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L., Parenti-Castelli, G. (1978) Biophysical studies on agents affecting the state of membrane lipids: Biochemical or pharmacological implications. *Mol. Cell. Biochem* 22:3.
- Lindemann C.B. (1978) A cAMP- induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell* 13:9-8.

- Llanos M.N., Morales P.J., Anabalon M.C. (1993) Characterization of the progesterone induced hamster sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 48:(suppl. 1):190.
- Maas D.H.A., Storey B.T., Mastroanni L. (1977) Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) *Fertil Steril.* 28: 981.
- Magargee S. F., Hammerstedt H.R., Baker C. (1993) Cholesterol transfer proteins from cauda epididimal and seminal plasma. *Biol. Reprod.* /vol. 48 / supl.1.
- Makler A.A., David R., Blumenfeld Z., Better O.S. (1981) Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil Steril.* 36:507 .
- Meizel S.S., Kenneth O., Turner. (1991) Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocr.* 11.R1-R5.
- Melendrez C., Berger T., Meizel S. (1993) Progesterone initiation of the porcine acrosome reaction *in vitro*. *Biol. Reprod.* 48 (suppl 1) :193.(abstrac)
- Mercado E., Hicks J.J., Drago C., Rosado A. (1974). Study of interaction of human spermatozoa membrane with ATP and cyclic-AMP. *Biochem. Res. Comm.* 56:185.
- Mercado E., Domingez R., Rosado A. (1992) Changes in membrane fluidity during epididymal maturation of rabbit spermatozoa . A study with the fluorescent probe diphenyl hexatrine. *ADV. Cont. Deliv. Sist.* 8:253.
- Mercado E., Reyes A., Rosado A. (1974) Interaction of hormonal steroids with human spermatozoa. *J. Steroid. Biochem.* 5:381
- Meyers S.A., Liu I. K. M., Overstreet J.W., Drobnis E.Z. (1993) Capacitation of stallion sperm *in vitro* assessed by progesterone - induced acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 48: (suppl.1):194.
- Mirny R.J., Meizel S.S. (1981) Potassium ion influx and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> , ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 19:77
- Nagae T., Yanagimachi R., Srivastava P.N., Yanagimachi H. (1986) Acrosome reaction in human spermatozoa. *Arc. Androl.* 26:93
- Nicoll D.A., Longoni S., Phillipson K.D. (1990) Molecular cloning and functional expression of cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger., *Science* 250:562.
- Nicolson G.H., Usui N., Yanagimachi R., Smith J.R. (1977) Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa . Changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *J. Cell. Biol.* 74: 950.
- Olson G. E., Danzo B., (1981) Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 24:431.
- Olson G. E., Nifsics M.R., Winfrey U.P., Rifkin J.M. (1987) Modification of the rat sperm flagellar plasma membrane during maturation in the epididymis. *J. Androl.* 8:129.
- Osman R.A., Andria M.L., Jones A.D., Meizel S.S. (1989) Steroid induced exocytosis: The human acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160: 828.

- Pariset C.C., Feinberg J.M., Dachoux J.L., Weiman S.J. (1985) Changes in calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity during epididymal maturation of spermatozoa. *J.Reprod. Fertil.* 74:105.
- Pariset C.C., Rousell C., Weimman S.J., Demaille J.G. (1983) Calmodulin intracellular concentration and cAMP- dependent protein kinase activity in human sperm samples in relation to sperm morphology and motility. *Gamete Res.* 8:17.
- Parks E J ., Hammerstedt R H . (1985) Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.*, 32:653.
- Pietrobon D, Di Virgilio F., Pozzan T. (1990) Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.*,193:599.
- Pizzo P. Zanovello P., Bronte V., Di Virgilio F. (1991) Extracellular ATPases lysis of mouse thymocytes and activates a plasma membrane ion channel *Biochem J.* 274. 139.
- Purvis K., Cusan L., Attramadal H., Ege A., Hansson V. (1982) Rat sperm enzymes durings epididymal transit. *J. Reprod Fertil.* 65:381 - 387.
- Purvis K., Egdetueit I. (1993) Segmental distribution of  $\alpha$ - glucosidase, ornitine decarboxilase and polyamines in the human epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 97:575.
- Rana P S. A ., Majumber C G ., Mistra S. Ghosh A. (1991). Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim. Biophys. Acta.* 106:185.
- Reuter H. (1991) Ins and outs of Ca<sup>2+</sup> transport. *Nature.*,349:567.
- Reyes A., Mercado E., Goicochea B., Rosado A. (1976) Participation of membrane sulfhidryl groups in the epididymal maturation of human and rabbit spermatozoa. *Fertil.Steril.* 27:1452.
- Rink T.J. (1977). Membrane potencial of guinea pig spermatozoa. *J. Reprod Fertil.*, 51:155.
- Rogers B.J., Ueno M., Yanagimachi R. (1981) Fertilization by guinea pig spermatozoa requires potassium ions. *Biol Reprod.* 25:639.
- Roldan E.R.S., Shibata S., Yanagimachi R. (1986) Efect of Ca<sup>2+</sup> chanel antagonists on the acrosome reaction of guinea pig and golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.*, 13:281.
- Rosado A., Velázquez A., Lara-Ricalde R. (1973) Cell polarography .II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa.*Fertil. Steril.* 24:349.
- Rosado A. (1988) Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y la reacción acrosomal. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 19: 253.
- Rufo G.A., Singh J.P., Babcock D.F., Lardy H.A. (1982) Purification and characterization of a calcium inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J. Biol. Chem;* 257:4627.
- Sadler E. S., Maller L. J. (1982) Identification of a steroid receptor on the surface of Xenopus Oocytes by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257:355.

- Sanchez-Bueno A, Sancho MJ, Cobbold PH, (1991) Progesterone and oestradiol increase cytosolic  $Ca^{2+}$  in single rat hepatocytes *Biochem J* 280:273.
- Schackman RW., Eddy E.M., Shaphiro B.M. (1978) The acrosome reaction and activation of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm: ion requirements and movements. *Dev. Biol.* 65:715
- Schatzman H.J. (1985) Calcium extrusion across the plasma membrane by calcium pump and the  $Ca^{2+}$ -  $Na^{+}$  exchange system. En: *Calcium and the Cell Physiology*, D. Marme Ed. Springer-Verlag. Berlin, 18.
- Shaphiro B.M., Schackmann R.W., Tombes R.M., Kazazoglou T. (1985) Cluded ionic and enzymatic regulation of sperm behavior *Curr. Topics Cell Regulation* 26:97.
- Shi Qi -Xian, Roldan E.R.S. (1995). Evidence that a  $GABA_A$ - like receptor is involved in progesterone- induced acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Biol. Reprod.* 52:373.
- Shi Qi-Xian, Roldan E.R.S. (1995) Bicarbonate/ $CO_2$  is not required for zona pellucida or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation *Biol. Reprod.* 52:540.
- Skudlarek D.M., Tulsani P.D.R. Nagdas K. S., Orebin -Crist M.C. (1993)  $\beta$ -D- galactosidase of rat spermatozoa : Sub cellular distribution, substrate specificity and molecular changes during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 49:204.
- Slaughter R.S., Garcia M.L. Cragoe E.J. Jr., Reeves J.P. Kaczorowski G.K. (1988) Inhibition of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal membrane vesicles. I. Mechanism of inhibition by amiloride analogues. *Biochemistry.* 27:2403.
- Stock CE., Bettis R., Lindsay K.S., Edmunds D.K., Fraser L.R. (1989) Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. *J. Reprod. Fertil.* 86:723.
- Storey B.T., Keyhan F.J. (1977) Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondrial. *Biol. Reprod.* 16:549.
- Suarez S.S., Wolf D.P., Meizel S. (1986) Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14:107.
- Suchard S.J., Lantanzio F.A., Rubin R.W. Presman B.C. (1982) Stimulation of catecholamine secretion from cultured chromaffin cells by an ionophore-mediated rise intracellular sodium. *J. Cell Biol.* 94:531.
- Tash J.S., Means A.R. (1982) Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.* 26: 745.
- Tesarik J., Mendoza C. (1993) Insights into the function of a sperm- surface progesterone receptor: Evidence of ligand - induced receptor aggregation and the implication of proteolysis. *Exp. Cell. Res.* 205 .111.
- Tesarik J., Mendoza C., Moos J. Carreras A. (1992) Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil. Steril.* 58:784-792.
- Tesarik J., Mendoza C., Moos J., Fénichel P., Fehlmann M. (1992) Progesterone action through aggregation of receptor on sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 308:116.

- Tesarik J., Mendoza C. (1992) Defective function of non genomic progesterone receptor as a sole sperm anomaly infertile patients. *Fertil. Steril.* 58:793.
- Thomas P., Meizel S. (1988) An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res.* 20:397.
- Tsien R.W., Tsien R.Y. (1990) Calcium channels, stores and oscillations. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6:715.
- Tulsani D.R.P., Skudlarek M.D., Orebin - Crist M.C. (1989) Novel  $\alpha$  - D - Manosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm interactions. *J. Cell. Biol.* 109: 1257.
- Tulsiani P.R. D., Skudlarek M D., Orebin- Crist M.C. (1989) Human sperm plasma membranes possess  $\alpha$  -D - Manosidase activity but no galactosyl transferase activity. *Biol.Reprod.* 42:843.
- Turner K.O., García M.A., Meizel S.S. (1994) Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction : The obligatory increase intracellular calcium independent of the chloride requirement. *Mol Cell. Endocr.* 101:221.
- Vijayaraghavan S., Hoskins D.D. (1989) Quantitation of bovine cytoplasmic calcium with quin -2 and fura-2 : evidence that external calcium does not have direct access to the sperm cytoplasm. *Cell* 45:254.
- Winkler M.M., Grainger J.L. (1978) Mechanism of action of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and other weak bases in the activation of sea urchin eggs. *Nature*, 273:536.
- Wistrom C.A., Meizel S.S. (1993) Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor / $\text{Cl}^-$  channel complex in the progesterone- initiated acrosome reaction. *Dev. Biol.* 159:679.
- Wong P.Y.D., Lee W.M., Tsang A.Y.F. (1981) The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa *in vitro*. *Exp. Cell. Res.* 131:97.
- Wong P.Y.D., Tsang A.Y.F. (1982) Studies on the binding of a 32 KDa rat epididymal protein to rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 27: 1239.
- Wong P.Y.D., Lee W.M. (1983) Potassium movement during sodium induced motility initiation in the rat caudal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 28: 206.
- Yanagimachi R. (1981) In *Fertilization and Embryonic Developments in vitro*. Mastroianni, J.D. Biggers, Eds. Plenum Press, New York, pp. 81 - 182.
- Yanagimachi R. (1994) *Mammalian fertilization En: The Physiology of Reproduction.*, E. Knobil, Neill D.J. Eds. Second edition Raven Press New York. pp. 189-317.
- Yeung C.H., Woolley D.M. (1984) Three-dimensional bend propagation in hamster sperm models and the direction of roll in free- swimming cells *Cell Motil* 4:215.
- Yudin A.I., Gottlieb W., Meizel S.S. (1988) Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res.* 20:11.